

5

Rekombinante Impfstoffe und deren Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft Fusionsmoleküle von Antigenen, die dafür kodierenden Nukleinsäuren und die Verwendung derartiger Fusionsmoleküle und Nukleinsäuren. Insbesondere betrifft die Erfindung Fusionsmoleküle, die ein Antigen und die Transmembranregion und cytoplasmatische Region eines MHC-Moleküls bzw. die cytoplasmatische Region eines MHC- oder eines SNARE-Moleküls umfassen.

Erfindungsgemäße Fusionsmoleküle sind für eine Vielzahl von Anwendungen verwendbar, einschließlich in Verfahren zur Induktion einer Immunreaktion in einem Säuger.

Antigen-spezifische T-Zell-Reaktionen werden durch antigene Peptide, die an die Bindungsgrube von Glykoproteinen des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC) gebunden sind, als Teil des Mechanismus des Immunsystems hervorgerufen, bei dem fremde Antigene identifiziert und eine Reaktion gegen sie ausgelöst wird. Die gebundenen antigenen Peptide interagieren mit T-Zell-Rezeptoren und modulieren so eine Immunreaktion. Die antigenen Peptide sind nicht-kovalent an bestimmte „Bindetaschen“ gebunden, die von polymorphen Resten der Bindungsgrube des MHC-Proteins gebildet werden.

MHC Klasse II-Moleküle sind heterodimere Glykoproteine, die aus α - und β - Ketten bestehen. Die α 1- und β 1-Domänen dieser Moleküle falten sich zusammen und bilden eine Peptid-Bindungsgrube. Antigene Peptide binden an das MHC-Molekül durch Interaktion zwischen Anker-Aminosäuren auf dem Peptid und den α 1- und β 1-Domänen. Die Kristallstruktur des

menschlichen Klasse II-HLA-DR1-Komplexes mit einem Influenzavirus-Peptid zeigt, dass sich die N- und C-terminalen Enden des gebundenen Peptids aus der Bindungsgrube erstrecken, so dass der C-Terminus des Peptids nahe zum N-Terminus der β -Kette liegt [Brown, J.H. et al., 1993, Nature 364:33-39; Stern, L.J. et al., 1994, Nature 368:215-221]. MHC Klasse I-Moleküle besitzen andere Domänen-Organisationen als MHC Klasse II-Moleküle, jedoch im Allgemeinen eine ähnliche Struktur mit einer Peptid-Bindestelle oder -grube, die zu den Membrandomänen entfernt liegt [vgl. z.B. Rudensky, A.Y. et al., 1991, Nature 353:622-627].

Der anfängliche Schritt bei der Präsentation eines fremden Protein-Antigens ist die Bindung des nativen Antigens an eine Antigen-präsentierende Zelle (APC). Nach Bindung an APCs dringen Antigene in die Zellen ein, entweder durch Phagozytose, Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Pinozytose.

Derartige internalisierte Antigene sind in intrazellulären Membrangebundenen Vesikeln, die Endosome genannt werden, lokalisiert. Nach einer Endosomen-Lysosomen-Fusion werden die Antigene in kleine Peptide durch in den Lysosomen gelegene zelluläre Proteasen prozessiert. Die Peptide assoziieren mit den α - und β -Ketten von MHC Klasse II-Molekülen innerhalb dieser Lysosomen. Diese MHC Klasse II-Moleküle, die zuvor im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert worden waren, werden sequentiell an die Golgi-Komplexe und sodann an das lysosomale Kompartiment transportiert. Der Peptid-MHC-Komplex wird auf der Oberfläche von APCs für eine T- und B-Zell-Aktivierung präsentiert. Daher sind die Zugängigkeit von proteolytischen Prozessierungsstellen in dem Antigen, die Stabilität der resultierenden Peptide in den Lysosomen und die Affinitäten der Peptide für MHC-Moleküle bestimmende Faktoren für die Immunogenität eines spezifischen Epitops.

Rekombinante Impfstoffe haben in der Human- und Veterinärmedizin eine besondere Bedeutung als Wirkstoffe und Arzneimittel für die Prophylaxe und Therapie von Infektions- und Krebserkrankungen. Ziel einer Impfung mit

einem rekombinanten Impfstoff ist, gegen ein definiertes Antigen eine spezifische Immunreaktion zu induzieren, die präventiv oder therapeutisch gegen definierte Krankheiten wirksam ist.

- 5 Ein für die Effektivität eines rekombinanten Impfstoffs wesentlicher Faktor ist die optimale Stimulation von T-Lymphozyten des immunisierten Organismus. So belegt eine Reihe von tierexperimentellen Untersuchungen, dass für eine effektive Immuntherapie von Tumoren sowohl die optimale Stimulation von CD8⁺- als auch CD4⁺-Lymphozyten notwendig ist. Die
- 10 bekannten Hauptformen von rekombinanten Vakzinen basieren auf rekombinanten Proteinen, synthetischen Peptidfragmenten, rekombinanten Viren und Nukleinsäureimpfstoffen auf DNA- bzw. RNA-Basis. In den letzten Jahren bekamen Impfstoffe auf DNA- und RNA-Nukleinsäurebasis eine zunehmende Bedeutung. Für sehr viele Ziele, unter anderem
- 15 Tumorantigene, lässt sich jedoch mit rekombinanten Impfstoffen auf Nukleinsäurebasis eine nur sehr schlechte bis gar keine Stimulation von CD4⁺-Lymphozyten erreichen. Daher wurde eine Reihe gentechnischer Modifikationen entwickelt, mit der Absicht, die Immunogenität von rekombinanten Impfstoffen zu erhöhen. Hierbei sind bisher verschiedene
- 20 Verfahren getestet worden, u.a. Verfremdung von Immunogenen durch Veränderung der Primärsequenz oder durch Fusion an Fremdepitope z.B. von Bakterien oder Viren [Lowenadler, B. et al., 1990, Eur. J. Immunol. 20: 1541-45; Clarke, B. E. et al., 1987, Nature 330: 381-84] und Herstellung von chimären Produkten, bestehend aus dem eigentlichen Antigen und
- 25 immunmodulatorischen Proteinen wie z.B. Zytokinen [Ruckert, R. et al., 1998, Eur. J. Immunol. 28: 3312-20; Harvill, E. T., J. M. Fleming, und S. L. Morrison, 1996, J. Immunol. 157: 3165-70]. Impfstoffe, die auf Verfremdung basieren, induzieren zwar verstärkte Immunantworten, haben jedoch den großen Nachteil, dass die Immunstimulation gegen das Fremdepitop
- 30 dominiert und dass Immunantworten gegen das eigentliche Vakzinetarget z.T. nur moderat bleiben.

Eine weitere attraktive Möglichkeit ist die Fusion mit Sequenzen von Proteinen, die eine Translokation des Proteins in degradierende Zellkompartimente erlauben sollen. Diese Modifikationen führen jedoch, wie mittlerweile bekannt, nur zu einer mäßig verbesserten Stimulation von CD4⁺-Lymphozyten und kaum zu einer Verstärkung von CD8⁺-Immunantworten [Wu, T. C. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 11671-11675; Bonini, C. et al., 2001, J. Immunol. 166: 5250-57, Su, Z. et al., 2002, Cancer Res. 62: 5041-5048].

Somit wäre es wünschenswert, über Impfstoffe zu verfügen, die die Antigenpräsentation und damit die Immunogenität gegen ein bestimmtes Antigen deutlich erhöhen. Es wäre weiterhin wünschenswert, Impfstoffe systematisch so modifizieren zu können, dass eine maximale Immunantwort durch CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten resultiert, ohne Fremdpeptide einführen zu müssen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch den Gegenstand der Patentansprüche gelöst.

Erfindungsgemäß konnte festgestellt werden, dass Fusionsmoleküle, die Antigenmoleküle und Teile von Histokompatibilitätsantigenen umfassen, bei einer Verwendung als Impfstoffe eine um >100-fach gesteigerte Immunogenität gegenüber den unmodifizierten Antigenen aufweisen und dass überraschenderweise sowohl Immunantworten von CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Lymphozyten in bisher noch nicht beschriebener Weise erhöht werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Fusionsmoleküle von Antigenmolekülen und die Verwendung derartiger Fusionsmoleküle.

In einem Aspekt betrifft die Erfindung ein Fusionsmolekül, das ein Antigen und die cytoplasmatische Region einer Kette eines MHC-Moleküls, bzw. ein

Antigen, eine Transmembranregion und die cytoplasmatische Region einer Kette eines MHC-Moleküls umfasst. Vorzugsweise sind sowohl die Transmembranregion als auch die cytoplasmatische Region von einem MHC-Molekül abgeleitet. Weiterhin umfasst das Fusionsmolekül vorzugsweise
5 keine MHC-Bindedomäne.

Die Erfindung betrifft ferner ein Fusionsmolekül, das ein Antigen und eine Kette eines MHC-Moleküls oder einen Teil davon umfasst, wobei der Teil mindestens die Transmembranregion und die cytoplasmatische Region der
10 Kette des MHC-Moleküls umfasst. Vorzugsweise umfasst der Teil der Kette eines MHC-Moleküls nicht die MHC-Bindedomäne oder Teile davon. Somit wird insbesondere ein Fusionsmolekül bereitgestellt, das ein Antigen und den Teil einer Kette eines MHC-Moleküls umfasst, der im Wesentlichen der Sequenz der Transmembranregion in Verbindung mit der cytoplasmatischen
15 Region eines MHC-Moleküls entspricht, wobei der Begriff „Transmembranregion in Verbindung mit der cytoplasmatischen Region“ den Abschnitt einer Kette eines MHC-Moleküls betrifft, der mit dem N-terminalen Ende der Transmembranregion beginnt und mit dem C-terminalen Ende der cytoplasmatischen Region, insbesondere dem C-terminalen Ende der
20 gesamten Kette des MHC-Moleküls abschließt. In dieser Ausführungsform entspricht die Verbindung der Transmembranregion mit der cytoplasmatischen Region der natürlich auftretenden Verbindung zwischen diesen Regionen.

25 Weiterhin wird erfindungsgemäß ein Fusionsmolekül bereitgestellt, das ein Antigen und eine Kette eines MHC-Moleküls oder einen Teil davon umfasst, wobei bei dem Teil im Wesentlichen die gesamten N-terminalen extrazellulären Domänen des MHC-Moleküls fehlen.

30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bestehen die erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle aus einer Fusion eines Antigens, gegebenenfalls mit einer Leitsequenz an seinem N-terminalen Ende, mit

einer Transmembranregion, vorzugsweise einer Transmembranregion einer Kette eines MHC-Moleküls, am C-terminalen Ende des Antigens und einer cytoplasmatischen Region einer Kette eines MHC-Moleküls am C-terminalen Ende der Transmembranregion.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfassen die erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle eine Leitsequenz, vorzugsweise eine Peptidsequenz mit Eigenschaften eines Sekretionssignals, das insbesondere in der Lage ist, die Translokation eines Proteins oder Peptids durch eine
10 Membran zu steuern. Als Leitsequenz kann das Sekretionssignal jedes Typ-I Transmembranproteins genutzt werden, wobei der Begriff „Typ-I Transmembranprotein“ solche Transmembranproteine betrifft, deren C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert ist. In einer besonderen Ausführungsform ist die Leitsequenz von einer Kette eines MHC-Moleküls
15 abgeleitet. Vorzugsweise befindet sich die Leitsequenz am N-terminalen Ende der erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung ein Fusionsmolekül, wobei im Wesentlichen die gesamten N-terminalen extrazellulären Domänen eines
20 MHC-Moleküls durch ein Antigen mit einer Leitsequenz an dessen N-terminalen Ende ersetzt sind.

In einem erfindungsgemäßen Fusionsmolekül ist vorzugsweise das Antigen an seinem N-Terminus kovalent mit dem C-Terminus einer Leitsequenz
25 verbunden und der C-Terminus des Antigenmoleküls ist mit dem N-Terminus der Transmembranregion verbunden, die ihrerseits am C-Terminus mit dem N-Terminus der cytoplasmatischen Region eines MHC-Moleküls verbunden ist.

30 Somit weist das erfindungsgemäße Fusionsmolekül vorzugsweise folgende Anordnung auf: N-Terminus-Leitsequenz/Antigen/Transmembranregion /cytoplasmatische Region-C-Terminus.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform besteht das erfindungsgemäße Fusionsmolekül im Wesentlichen aus der Leitsequenz, dem Antigen, der Transmembranregion und der cytoplasmatischen Region.

5

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen ein Peptid, Polypeptid oder Protein und das erfindungsgemäße Fusionsmolekül ist ein Protein oder Polypeptid.

10 In einer Ausführungsform sind mehrere Antigene, die gleich oder verschieden sein können, in dem erfindungsgemäßen Fusionsmolekül vorhanden, d.h. mindestens 2, vorzugsweise 2 bis 10, mehr bevorzugt 2 bis 5, noch mehr bevorzugt 2 bis 3, insbesondere 2 Antigene. Diese mehrfach gekoppelten Antigene können getrennt voneinander oder in Serie
15 nacheinander, gegebenenfalls durch einen Linker getrennt, als Tandemkonstrukte vorliegen. Vorzugsweise wird dadurch bei Verabreichung eine Immunreaktion gegen verschiedene Antigene ausgelöst.

Das Antigen kann vollständig oder verkürzt sein, d.h. es enthält nur einen
20 Teil des natürlichen Proteins oder Polypeptids, das als Antigen dient.

Vorzugsweise sind die Leitsequenz und/oder die Transmembranregion der erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle von MHC-Molekülen, insbesondere der Klasse I oder II abgeleitet. Mehr bevorzugt sind die Leitsequenz und/oder die
25 Transmembranregion und/oder die cytoplasmatische Region der erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle von MHC-Molekülen, insbesondere der Klasse I oder II abgeleitet.

Erfindungsgemäß können auch eine oder mehrere, vorzugsweise flexible
30 Linkersequenzen (Verbindungssequenzen) in dem Fusionsmolekül vorhanden sein, die zwischen der Leitsequenz und dem Antigen, zwischen dem Antigen und der Transmembranregion und/oder zwischen der

Transmembranregion und der cytoplasmatischen Region liegen können. Vorzugsweise umfasst erfindungsgemäß eine Linkersequenz etwa 7 bis 20 Aminosäuren, besser etwa 8 bis 16 Aminosäuren, und insbesondere etwa 8 bis 12 Aminosäuren.

5

In erfindungsgemäßen Fusionsmolekülen ist die Linkersequenz vorzugsweise flexibel und hält so das damit verbundene Peptid nicht in einer einzigen, ungewünschten Konformation. Der Linker umfasst vorzugsweise vor allem Aminosäuren mit kleinen Seitenketten wie Glycin, Alanin und Serin, um eine Flexibilität zu ermöglichen. Vorzugsweise enthält die Linkersequenz keinen Prolinrest, der die Flexibilität hemmen könnte.

In einer weiteren Ausführungsform sind die Leitsequenz, das Antigen, die Transmembranregion und/oder die cytoplasmatische Region direkt ohne einen Linker miteinander verbunden.

Die Leitsequenz weist vorzugsweise die in SEQ ID NO: 2 gezeigte Sequenz oder eine davon abgeleitete Sequenz auf bzw. wird durch die in SEQ ID NO: 1 gezeigte Sequenz oder eine davon abgeleitete Sequenz kodiert. Die Transmembran-cytoplasmatische Region weist vorzugsweise die in SEQ ID NO: 4 bzw. 6 gezeigte Sequenz oder eine davon abgeleitete Sequenz auf bzw. wird durch die in SEQ ID NO: 3 bzw. 5 gezeigte Sequenz oder eine davon abgeleitete Sequenz kodiert.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen ist die Transmembran-cytoplasmatische bzw. die ausschließlich cytoplasmatische Region von sequenzverwandten MHC-Molekülen (u.a. HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-DRa, HLA-DRb, HLA-DQa, HLA-DQb, HLA-DPa, HLA-DPb, CD1a, CD1b, CD1c) abgeleitet. Bevorzugte Transmembran-cytoplasmatische Regionen weisen eine Sequenz auf, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den in SEQ ID NO: 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 dargestellten Sequenzen und davon abgeleiteten Sequenzen. In weiteren

Ausführungsformen weisen die ausschließlich cytoplasmatischen Regionen eine Sequenz auf, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den in SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 dargestellten Sequenzen und davon abgeleiteten Sequenzen. In weiteren Ausführungsformen ist auch die Verwendung von abgewandelten Sequenzen, z.B. modifizierten oder orthologen Sequenzen aus anderen Organismen, vorgesehen. Besonders bevorzugt sind dabei Sequenzen, die am C-terminalen Ende eine Homologie von mehr als 60% zu den in SEQ ID NO: 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42 gezeigten Sequenzen aufweisen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Fusionsmolekül die in SEQ ID NO: 12 bzw. 14 gezeigte Aminosäuresequenz oder eine davon abgeleitete Sequenz.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Fusionsmolekül, umfassend ein Antigen und ein SNARE-Protein (insbesondere Cis-golgi SNARE p28, VTI1b, Membrin, Pallidin, Syntaxin-5, Syntaxin-6, Syntaxin-7, Syntaxin-8, Syntaxin-10, SYNTAXIN-10a, Syntaxin-11, Syntaxin-12, Syntaxin-17, VAMP-2, VAMP-3, VAMP-4, VAMP-7, VAMP8, VTI1-a-beta, XP350893, LIP5 (SEQ ID NO: 43-63)) bzw. eine Sequenz, welche ein oder mehrere SNARE-Motive beinhaltet. Durch Fusion eines Antigens mit einem SNARE-Protein oder SNARE-Motiv (bevorzugt am C-Terminus des SNARE-Proteins oder -Motivs) kann der Transport des Antigens gezielt in ein definiertes Kompartiment erfolgen (z.B. Lysosomen und Endosomen). Durch einen derartigen gezielten Transport können ferner immunogene Epitope des Antigens in einem Kompartiment generiert und präsentiert werden, was experimentell feststellbar ist.

SNARE-Proteine sind membranständige Proteine, deren gemeinsames Merkmal das 60-70 Aminosäuren umfassende SNARE-Motiv ist. SNARE-Proteine sind funktionell in dem Transport und der Fusion von Vesikeln in

der Zelle involviert. Eukaryontische Organismen verfügen über eine Vielzahl verschiedener SNARE-Proteine, die mit unterschiedlichen Vesikelmembranen in der Zelle (u.a. Endosomen-, Lysosomen-, Golgi-, Plasmamembran) assoziiert sind. Die cytoplasmatischen Regionen der SNARE-Proteine üben eine Doppelfunktion aus. Zum einen dienen sie als „Trafficking“-Signale (Adressetiketten), die den Zielort des Proteins und der dazugehörigen Membran vorgeben. Zum anderen können die Domänen durch Hetero- und Homoassoziation (Zusammenlagerung) zur Verschmelzung unterschiedlicher Vesikel (z.B. Endosomen mit Lysosomen) beitragen.

Erfindungsgemäß können auch die SNARE-Antigen-Fusionsmoleküle Linkersequenzen zwischen dem SNARE-Anteil und dem Antigenanteil beinhalten. Ferner sind bezüglich des Antigens und der Linkersequenz der SNARE-Antigen-Fusionsmoleküle alle vorstehend beschriebenen Ausführungsformen umfasst. Bezüglich der SNARE-Antigen-Fusionsmoleküle umfasst ein Linker vorzugsweise 80-120 Aminosäuren. In einer besonderen Ausführungsform beinhaltet der Linker eine Transmembranregion. Somit betrifft die Erfindung Fusionsmoleküle, die ein SNARE-Protein oder ein SNARE-Motiv in Fusion mit einem Antigen oder einer Transmembranregion und einem Antigen umfassen. Solche Fusionsmoleküle sind beispielsweise in Abbildung 7 gezeigt.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung Nukleinsäuren und Derivate davon, die für die oben beschriebenen Fusionsmoleküle kodieren und vorzugsweise diese Fusionsmoleküle exprimieren können. Im folgenden umfasst der Begriff „Nukleinsäure“ auch die Derivate davon.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfasst die Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kodiert, die in SEQ ID NO: 11 bzw. 13 gezeigte Nukleinsäuresequenz oder eine davon abgeleitete Sequenz.

Die Erfindung betrifft auch Wirtszellen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten.

Die Wirtszelle kann ferner eine Nukleinsäure umfassen, die für ein HLA-Molekül kodiert. In einer Ausführungsform exprimiert die Wirtszelle das HLA-Molekül endogen. In einer weiteren Ausführungsform exprimiert die Wirtszelle das HLA-Molekül rekombinant. Vorzugsweise ist die Wirtszelle nicht-proliferativ. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Wirtszelle eine Antigen-präsentierende Zelle, insbesondere eine dendritische Zelle, ein Monozyt oder ein Makrophage.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, insbesondere eine Vakzine, die ein oder mehrere der erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle und/oder eine oder mehrere der dafür kodierenden Nukleinsäuren und/oder eine oder mehrere der erfindungsgemäßen Wirtszellen umfasst.

In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Erhöhung der Menge an MHC/Peptid-Komplexen in einer Zelle bereitgestellt, wobei das Verfahren die Bereitstellung eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure für die Zelle umfasst. Vorzugsweise befindet sich die Zelle in einem Lebewesen und das Verfahren umfasst die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure an das Lebewesen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Zelle eine Antigen-präsentierende Zelle, insbesondere eine dendritische Zelle, ein Monozyt oder ein Makrophage.

In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Steigerung der Präsentation von Zelloberflächenmolekülen auf Zellen bereitgestellt, die in der Lage sind, Antigene zu präsentieren (wie B-Zellen und Makrophagen, im Allgemeinen „APC“ genannt). Die Verstärkung der

Antigen-präsentierenden Aktivität solcher Zellen erfolgt durch Bereitstellung eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure für die Zellen. Eine derartige Verstärkung der Antigen-präsentierenden Aktivität verstärkt wiederum vorzugsweise die primäre
5 Aktivierung von T-Zellen, insbesondere von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten, die gegenüber dem Antigen reagieren. Vorzugsweise befindet sich die Zelle in einem Lebewesen und das Verfahren umfasst die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure an das Lebewesen.

10

In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zum Auslösen einer Immunreaktion bei einem Lebewesen bereitgestellt, wobei das Verfahren die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls und/oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure und/oder einer
15 erfindungsgemäßen Wirtszelle an das Lebewesen umfasst.

In einem weiteren Aspekt wird erfindungsgemäß ein Verfahren zur Stimulierung oder Aktivierung von T-Zellen, insbesondere CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten, in vitro oder in einem Lebewesen, insbesondere einem
20 Patienten, bereitgestellt, wobei das Verfahren die Bereitstellung für die T-Zellen bzw. Verabreichung an das Lebewesen eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls und/oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure und/oder einer erfindungsgemäßen Wirtszelle umfasst. Eine derartige Stimulierung oder Aktivierung äußert sich vorzugsweise in einer Expansion, cytotoxischen
25 Reaktivität und/oder Zytokinausschüttung der T-Zellen.

In einem weiteren Aspekt wird ein Verfahren zur Behandlung, Vakzinierung oder Immunisierung eines Lebewesens bereitgestellt, wobei das Verfahren die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls und/oder
30 einer dafür kodierenden Nukleinsäure und/oder einer erfindungsgemäßen Wirtszelle an das Lebewesen umfasst. Dabei werden insbesondere solche Antigene in dem erfindungsgemäßen Fusionsmolekül oder der dafür

kodierenden Nukleinsäure eingesetzt, die ohne die erfindungsgemäße Veränderung als für die beabsichtigte Behandlung, Vakzinierung oder Immunisierung wirksam bekannt sind.

- 5 Die vorstehend beschriebenen Verfahren eignen sich insbesondere für eine Behandlung oder Prophylaxe von infektiösen Erkrankungen, die beispielsweise von Bakterien oder Viren verursacht werden. In bestimmten Ausführungsformen ist das erfindungsgemäß verwendete Antigen von einem infektiösen Erreger wie Hepatitis A, B, C, HIV, Mykobakterien, 10 Malariaerreger, Erreger von SARS, Herpesvirus, Influenzavirus, Poliovirus bzw. von bakteriellen Erregern wie Chlamydien und Mykobakterien abgeleitet. Eine besonders nützliche Anwendung der vorliegenden Erfindung liegt in der Krebs-Immuntherapie oder -Vakzinierung, wo insbesondere eine Aktivierung von Tumorantigen-reaktiven T-Zellen verstärkt wird, wodurch 15 die Aussicht für eine T-Zell-Immuntherapie oder -Vakzinierung gegen Tumorzellen verbessert wird.

- In spezifischen Ausführungsformen ist das erfindungsgemäß verwendete Antigen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den folgenden Antigenen: 20 p53, vorzugsweise kodiert von der in SEQ ID NO: 66 gezeigten Sequenz, ART-4, BAGE, ss-Catenin/m, Bcr-abL CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27/m, CDK4/m, CEA, CLAUDIN-12, c-MYC, CT, Cyp-B, DAM, ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gap100, HAGE, HER-2/neu, HPV-E7, HPV-E6, HAST-2, hTERT (oder hTRT), LAGE, LDLR/FUT, MAGE-A, vorzugsweise MAGE-A1, 25 MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11 oder MAGE-A12, MAGE-B, MAGE-C, MART- 1/Melan-A, MC1R, Myosin/m, MUC1, MUM-1, -2, -3, NA88-A, NF1, NY-ESO-1, NY-BR-1, p190 minor bcr-abL Pml/RARa, PRAME, Proteinase-3, PSA, PSM, RAGE, RU1 oder RU2, SAGE, SART-1 oder SART-3, SCGB3A2, 30 SCP1, SCP2, SCP3, SSX, SURVIVIN, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, TRP-2, TRP-2/INT2, TPTE und WT, vorzugsweise WT-1, insbesondere kodiert von der in SEQ ID NO: 65 gezeigten Sequenz.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die Begriffe „Domäne“ oder „Region“ betreffen einen bestimmten Teil einer Aminosäuresequenz, der vorzugsweise mit einer bestimmten Funktion oder Struktur in Zusammenhang gebracht werden kann. Zum Beispiel weisen die α - und β -Polypeptide eines MHC-Klasse II-Moleküls zwei Domänen, $\alpha 1$, $\alpha 2$ bzw. $\beta 1$, $\beta 2$, eine Transmembranregion und eine cytoplasmatische Region auf. In ähnlicher Weise weist die α -Kette von MHC-Klasse I-Molekülen drei Domänen, $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$, eine Transmembranregion und eine cytoplasmatische Region auf.

In einer Ausführungsform wird bei einer Auswahl der Sequenz einer bestimmten Domäne oder Region für eine Deletion oder einen Einbau in ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül die gesamte Domäne oder Region umfasst. Um dieses sicherzustellen, kann die Sequenz der betreffenden Domäne oder Region verlängert sein, um Teile eines Linkers oder sogar Teile der benachbarten Domäne oder Region zu beinhalten. Der Begriff „im Wesentlichen“ in Bezug auf eine Domäne oder Region ist in diesem Sinne zu verstehen.

Der Begriff „Transmembranregion“ betrifft den Teil eines Proteins, der im Wesentlichen den sich in einer zellulären Membran befindlichen Anteil ausmacht und vorzugsweise einer Verankerung des Proteins in der Membran dient. Vorzugsweise ist erfindungsgemäß eine Transmembranregion eine Aminosäuresequenz mit einem einzelnen Durchtritt durch die Membran. Jedoch kann in bestimmten Ausführungsformen auch eine Transmembranregion verwendet werden, die mehr als einen Durchtritt durch die Membran aufweist. Die Transmembranregion wird im Allgemeinen 15-25 vorzugsweise hydrophobe ungeladene Aminosäuren aufweisen, die beispielsweise eine α -helikale Konformation einnehmen. Vorzugsweise ist die Transmembranregion von einem Protein, ausgewählt aus der Gruppe

bestehend aus MHC-Molekülen, Immunglobulinen, CD4, CD8, der CD3- ζ -Kette, der CD3- γ -Kette, der CD3- δ -Kette und der CD3- ϵ -Kette abgeleitet.

Typischerweise besteht die Transmembranregion im Fall der α - und β -Ketten
5 des MHC Klasse II-Moleküls aus etwa 20 hydrophoben Aminosäuren, die mit dem Carboxy-terminalen Ende des Antigens verbunden sind. Diese Reste erlauben ein Überspannen der Membran durch das Protein. Die Transmembranregion endet mit etwa 6-32 Resten, die den cytoplasmatischen Schwanz umfassen, am Carboxy-terminalen Ende einer
10 jeden dieser Ketten. Es wurde gezeigt, dass diese Transmembran- und cytoplasmatischen Regionen durch Sequenzen ersetzt werden können, die eine GPI-Bindung signalisieren, und dass die chimären GPI-verankerten Klasse II-Moleküle Membran-gebunden sind (Wettstein, D.A., J.J. Boniface, P.A. Reay, H. Schild und M.M. Davis, 1991, J. Exp. Med. 174:219-228).
15 Solche Ausführungsformen sind erfindungsgemäß von dem Begriff „Transmembranregion“ umfasst. GPI-gebundene Membran-Ankerdomänen wurden in einer Reihe von Proteinen definiert, einschließlich Verfall-beschleunigender Faktor (decay accelerating factor; DAF), CD59 und menschlicher placentaler alkalischer Phosphatase (HPAP) (Wettstein, D.A.,
20 J.J. et al., 1991, J. Exp. Med. 174:219-228). Zum Beispiel sind die 38 Carboxy-terminalen Aminosäuren von HPAP ausreichend für eine Funktion als Signalsequenz für eine Bindung von GPI. Falls die für diese Domäne kodierende DNA-Sequenz mit einem sekretierten Molekül, wie dem löslichen Teil der MHC Klasse II- α - oder - β -Kette verbunden wird, bildet sich ein
25 Membran-gebundenes chimäres Molekül (Wettstein, D.A. et al., 1991, J. Exp. Med. 174:219-228) und ein derartiges Verfahren kann für die Verankerung von Fusionsmolekülen der Erfindung an eine Zellmembran eingesetzt werden.

30 Der Begriff „Haupt-Histokompatibilitätskomplex“ und die Abkürzung „MHC“ betreffen einen Komplex von Genen, der in allen Vertebraten auftritt. MHC-Proteine oder -Moleküle fungieren bei einer Signalgebung zwischen

- Lymphozyten und Antigen-präsentierenden Zellen in normalen Immunreaktionen dadurch, dass sie Peptide binden und sie für eine mögliche Erkennung durch T-Zell-Rezeptoren (TCR) präsentieren. MHC-Moleküle binden Peptide in einem intrazellulären Prozessierungskompartiment und präsentieren diese Peptide auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen gegenüber T-Zellen. Die menschliche MHC-Region, auch als HLA bezeichnet, findet sich auf Chromosom 6 und beinhaltet die Klasse I-Region und die Klasse II-Region.
- Der Begriff „MHC-Klasse I“ oder „Klasse I“ betrifft die Haupt-Histokompatibilitätskomplex-Klasse I-Proteine oder -Gene. Innerhalb der MHC-Klasse I-Region finden sich beim Menschen die HLA-A-, HLA-B-, HLA-C-, HLA-E-, HLA-F-, CD1a-, CD1b- und CD1c-Unterregionen.
- Die α -Ketten der Klasse I sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 44 kDa. Die Polypeptidkette ist etwas über 350 Aminosäurereste lang. Sie kann in drei funktionelle Regionen unterteilt werden: eine externe, eine transmembranöse und eine cytoplasmatische Region. Die externe Region ist 283 Aminosäurereste lang und in drei Domänen, $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 3$, unterteilt. Die Domänen und Regionen werden gewöhnlich von separaten Exons des Klasse I-Gens kodiert. Die transmembrane Region umspannt die Lipid-Doppelschicht der Plasmamembran. Sie besteht aus 23 zumeist hydrophoben Aminosäureresten, die in einer α -Helix angeordnet sind. Die cytoplasmatische Region, d.h. der dem Cytoplasma zugewandte Teil, der sich an die Transmembranregion anschließt, ist typischerweise 32 Aminosäurereste lang und hat die Fähigkeit, mit den Elementen des Cytoskeletts zu interagieren. Die α -Kette interagiert mit $\beta 2$ -Mikroglobulin und bildet so α - $\beta 2$ -Dimere auf der Zelloberfläche.
- Der Begriff „MHC-Klasse II“ oder „Klasse II“ betrifft die Haupt-Histokompatibilitätskomplex-Klasse II-Proteine oder -Gene. Innerhalb der MHC-Klasse II-Region finden sich im Menschen die DP-, DQ- und DR-

Subregionen für Klasse II- α -Ketten- und - β -Ketten-Gene (d.h. DP α , DP β , DQ α , DQ β , DR α und DR β).

Klasse II-Moleküle sind Heterodimere, die aus je einer α - und einer β -Kette
5 bestehen. Beide Ketten sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 31-34 kDa (α) oder 26-29 kDa (β). Die Gesamtlänge der α -Ketten variiert von 229 bis 233 Aminosäureresten, die der β -Ketten von 225 bis 238 Resten. Sowohl α - als auch β -Ketten bestehen aus einer externen Region, einem verbindenden Peptid, einer transmembranösen Region und einem
10 cytoplasmatischen Schwanz. Die externe Region besteht aus zwei Domänen, α 1 und α 2 oder β 1 und β 2. Das verbindende Peptid ist in α - und β -Ketten 13 bzw. 9 Reste lang. Es verbindet die zweite Domäne mit der transmembranösen Region, die sowohl in α - als auch in β -Ketten aus 23 Aminosäureresten besteht. Die Länge der cytoplasmatischen Region, d.h. der
15 dem Cytoplasma zugewandte Teil, der sich an die Transmembranregion anschließt, variiert von 3 bis 16 Resten in α -Ketten und von 8 bis 20 Resten in β -Ketten.

Erfindungsgemäß betrifft der Begriff „Kette eines MHC-Moleküls“ die α -Kette
20 eines MHC-Klasse I-Moleküls bzw. die α - und β -Ketten eines MHC-Klasse II-Moleküls. Die α -Ketten eines MHC-Klasse I-Moleküls, von denen die erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle abgeleitet sein können, umfassen die HLA-A-, -B- und -C- α -Ketten. Die α -Ketten eines MHC-Klasse II-Moleküls, von denen die erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle abgeleitet sein können,
25 umfassen HLA-DR-, -DP- und -DQ- α -Ketten, insbesondere HLA-DR1-, HLA-DR2-, HLA-DR4-, HLA-DQ1-, HLA-DQ2- und HLA-DQ8- α -Ketten und insbesondere α -Ketten, die von DRA*0101-, DRA*0102-, DQA1*0301- oder DQA1*0501-Allelen kodiert werden. Die β -Ketten eines MHC-Klasse II-Moleküls, von denen die erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle abgeleitet sein
30 können, umfassen HLA-DR-, -DP- und -DQ- β -Ketten, insbesondere HLA-DR1-, HLA-DR2-, HLA-DR4-, HLA-DQ1-, HLA-DQ2- und HLA-DQ8- β -Ketten

und insbesondere β -Ketten, die von DRB1*01-, DRB1*15-, DRB1*16-, DRB5*01-, DQB1*03- und DQB1*02-Allelen kodiert werden.

Der Begriff „MHC-Bindedomäne“ betrifft die „MHC-Klasse I-Bindedomäne“ und „MHC-Klasse II-Bindedomäne“.

Der Begriff „MHC-Klasse I-Bindedomäne“ betrifft die Region eines MHC-Klasse I-Moleküls oder einer MHC-Klasse I-Kette, die für eine Bindung an ein antigenes Peptid notwendig ist. Eine MHC-Klasse I-Bindedomäne wird vorwiegend durch die α 1- und α 2-Domänen der MHC-Klasse I- α -Kette gebildet. Obwohl die α 3-Domäne der α -Kette und β 2-Mikroglobulin keine essentiellen Teile der Bindedomäne darstellen, sind sie vermutlich für eine Stabilisierung der Gesamtstruktur des MHC-Klasse I-Moleküls wichtig und daher schließt der Begriff „MHC-Klasse I-Bindedomäne“ diese Regionen vorzugsweise ein. Eine MHC-Klasse I-Bindedomäne kann auch im Wesentlichen als die extrazelluläre Domäne eines MHC-Klasse I-Moleküls definiert werden, was sie von den Transmembran- und cytoplasmatischen Regionen unterscheidet.

Der Begriff „MHC-Klasse II-Bindedomäne“ betrifft die Region eines MHC-Klasse II-Moleküls oder einer MHC-Klasse II-Kette, die für die Bindung an ein antigenes Peptid notwendig ist. Eine MHC-Klasse II-Bindedomäne wird vorwiegend durch die α 1- und β 1-Domänen der MHC-Klasse II- α - und - β -Ketten gebildet. Die α 2- und β 2-Domänen dieser Proteine sind vermutlich jedoch auch für eine Stabilisierung der Gesamtstruktur der MHC-Bindegrube wichtig und daher schließt der Begriff „MHC-Klasse II-Bindedomäne“ erfindungsgemäß vorzugsweise diese Regionen ein. Eine MHC-Klasse II-Bindedomäne kann auch im Wesentlichen als die extrazelluläre Domäne eines MHC-Klasse II-Moleküls definiert werden, was sie von der Transmembran- und cytoplasmatischen Domäne unterscheidet.

Die genaue Anzahl an Aminosäuren in den verschiedenen MHC-Moleküldomänen oder -Regionen variiert abhängig von der Säugerspezies sowie zwischen Genklassen innerhalb einer Spezies. Bei einer Auswahl der Aminosäuresequenz einer bestimmten Domäne oder Region ist vielmehr die Aufrechterhaltung der Funktion der Domäne oder Region wichtig als die genaue strukturelle Definition, die auf der Anzahl von Aminosäuren basiert. Ferner ist dem Fachmann bekannt, dass die Funktion auch aufrechterhalten werden kann, wenn etwas weniger als die gesamte Aminosäuresequenz der ausgewählten Domäne oder Region verwendet wird.

Der Begriff „Antigen“ betrifft ein Agens, gegen das eine Immunreaktion erzeugt werden soll. Der Begriff „Antigen“ umfasst insbesondere Proteine, Peptide, Polysaccharide, Nukleinsäuren insbesondere RNA und DNA sowie Nukleotide. Der Begriff „Antigen“ umfasst auch derivatisierte Antigene als erst durch Umwandlung (z.B. intermediär im Molekül, durch Komplettierung mit Körpereiwiss) antigen werdende – und sensibilisierende – Sekundärschubstanz und konjugierte Antigene, die durch künstlichen Einbau von Atomgruppen (z.B. Isocyanate, Diazoniumsalze) eine neue konstitutive Spezifität aufweisen. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen ein Tumorantigen, d.h. ein Bestandteil von Krebszellen, die dem Cytoplasma, der Zelloberfläche und dem Zellkern entstammen können, insbesondere diejenigen, die intrazellulär oder als Oberflächenantigene an Tumorzellen vorzugsweise vermehrt entstehenden Antigene. Beispiele sind das karzinoembryonale Antigen, α 1-Fetoprotein, Isoferritin und fetales Sulfoglykoprotein, α 2-H-Ferroprotein und γ -Fetoprotein und verschiedene Virustumorantigene. In einer weiteren Ausführungsform ist das Antigen ein Virusantigen wie virale Ribonukleoproteine oder Hüllproteine. Insbesondere sollte das Antigen oder Peptide davon von MHC-Molekülen präsentiert werden und dadurch zur Modulation, insbesondere Aktivierung von Zellen des Immunsystems, vorzugsweise CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten, insbesondere über die Modulation der Aktivität eines T-Zell-Rezeptors fähig sein und somit vorzugsweise die T-Zell-Vermehrung induzieren.

Der Begriff „MHC/Peptid-Komplex“ betrifft einen nicht-kovalenten Komplex der Bindedomäne eines MHC-Klasse I- bzw. MHC-Klasse II-Moleküls und eines MHC-Klasse I- bzw. MHC-Klasse II-Bindepeptids.

5

Der Begriff „MHC-Bindepeptid“ oder „bindendes Peptid“ betrifft ein Peptid, das an ein MHC-Klasse I- und/oder ein MHC-Klasse II-Molekül bindet. Im Fall von Klasse I-MHC/Peptid-Komplexen sind die Bindepeptide typischerweise 8-10 Aminosäuren lang, obwohl längere oder kürzere Peptide
10 wirksam sein können. Im Fall von Klasse II-MHC/Peptid-Komplexen sind die Bindepeptide typischerweise 10-25 Aminosäuren lang und insbesondere 13-18 Aminosäuren lang, obwohl längere und kürzere Peptide wirksam sein können.

15 Erfindungsgemäße Fusionsmoleküle und die dafür kodierenden Nukleinsäuren können im Allgemeinen durch rekombinante DNA-Techniken wie Herstellung von Plasmid-DNA, Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen, Ligation von DNA, Transformation oder Transfektion eines Wirts, Kultivierung des Wirts und Isolierung und Reinigung des
20 exprimierten Fusionsmoleküls hergestellt werden. Solche Verfahren sind bekannt und z.B. in Sambrook et al., Molecular Cloning, (2. Auflage, 1989) beschrieben.

Für das Antigen kodierende DNA kann durch Isolation von DNA aus
25 natürlichen Quellen oder durch bekannte Syntheseverfahren wie dem Phosphatdiesterverfahren erhalten werden; vgl. z.B. Oligonucleotide Synthesis, IRL Press (M.J. Gait, Hrsg., 1984). Synthetische Oligonukleotide können auch mit Hilfe käuflich erhältlicher automatischer Oligonukleotid-Synthesegeräte hergestellt werden.

30

Die Anteile von MHC-Moleküle der erfindungsgemäßen Fusionsmoleküle entsprechen in Bezug auf die Aminosäuresequenz in geeigneter Weise

natürlich vorkommenden MHC-Molekülen von Mensch, Maus oder anderen Nagern oder anderen Säugern oder sind Derivate davon.

Für MHC-Proteine kodierende DNA-Quellen sind bekannt, wie menschliche lymphoblastoide Zellen. Nach einer Isolierung kann das für das MHC-Molekül kodierende Gen oder ein interessierender Teil davon durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder andere bekannte Verfahren amplifiziert werden. Geeignete PCR-Primer für die Amplifikation des Gens für das MHC-Peptid können Restriktionsstellen an das PCR-Produkt anfügen.

Vorzugsweise werden erfindungsgemäß DNA-Konstrukte hergestellt, die für die Leitsequenz, die Transmembranregion und die cytoplasmatische Region kodierende Nukleinsäuresequenzen umfassen und die eine Restriktionsschnittstelle zwischen der Leitsequenz und der Transmembranregion enthalten, so dass im Wesentlichen jede für ein interessierendes Antigen kodierende Nukleotidsequenz in das Konstrukt eingebunden werden kann.

In einem bevorzugten Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer Fusionsmoleküle werden DNA-Sequenzen so angeordnet, dass das C-terminale Ende der Leitsequenz an das N-terminale Ende des Antigens, das C-terminale Ende des Antigens an das N₂-terminale Ende der Transmembranregion, und das C-terminale Ende der Transmembranregion an das N-terminale Ende der cytoplasmatischen Region gebunden ist. Wie vorstehend erörtert, werden vorzugsweise Restriktionsschnittstellen zwischen das Ende der Leitsequenz und den Anfang der Transmembranregion eingebaut, so dass im Wesentlichen jede Nukleinsäure, die für ein interessierendes Antigen kodiert, an die Nukleinsäuresequenz für die Transmembranregion gebunden werden kann.

Ein exprimiertes erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kann isoliert und in an sich bekannter Weise gereinigt werden. Typischerweise wird das

Kulturmedium zentrifugiert und der Überstand sodann durch Affinitäts- oder Immunoaffinitätsverfahren, umfassend die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die an das exprimierte Fusionsmolekül binden, gereinigt. Das Fusionsmolekül kann auch eine Sequenz enthalten, die die
5 Reinigung unterstützt, z.B. ein 6xHis-Tag.

Die Fähigkeit eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls, die Aktivität eines T-Zell-Rezeptors zu modulieren (einschließlich Inaktivierung der T-Zell-Reaktionen) kann einfach durch einen in vitro-Test bestimmt werden.

10 Typischerweise werden T-Zellen für die Tests durch transformierte T-Zelllinien bereitgestellt, wie T-Zell-Hybridome oder T-Zellen, die aus einem Säuger wie einem Menschen oder einem Nagetier wie einer Maus isoliert werden. Geeignete T-Zell-Hybridome sind frei verfügbar oder können in an sich bekannter Weise hergestellt werden. T-Zellen können in an sich
15 bekannter Weise aus einem Säuger isoliert werden; vgl. z.B. Shimonkevitz, R. et al., 1983, J. Exp. Med. 158:303.

Ein geeigneter Test zur Bestimmung, ob ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül zur Modulation der Aktivität von T-Zellen fähig ist, erfolgt
20 wie folgt durch die nachstehenden Schritte 1-4. T-Zellen exprimieren in geeigneter Weise einen Marker, der getestet werden kann und der T-Zell-Aktivierung oder Modulation der T-Zell-Aktivität nach Aktivierung anzeigt. So kann das Maus-T-Zell-Hybridom DO11.10, das Interleukin-2 (IL-2) bei einer Aktivierung exprimiert, verwendet werden. IL-2-Konzentrationen
25 können gemessen werden, um zu bestimmen, ob ein spezifisches präsentierendes Peptid zur Modulation der Aktivität dieses T-Zell-Hybridoms fähig ist. Ein derartiger geeigneter Test erfolgt durch die nachstehenden Schritte:

1. T-Zellen werden z.B. aus einem interessierenden T-Zell-Hybridom oder
30 durch Isolierung aus einem Säuger erhalten.

2. Die T-Zellen werden unter Bedingungen kultiviert, die eine Vermehrung erlauben.

3. Die wachsenden T-Zellen werden mit Antigen-präsentierenden Zellen in Kontakt gebracht, die ihrerseits mit einem erfindungsgemäßen Fusionsmolekül oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure in Kontakt gebracht wurden.

4. Die T-Zellen werden auf einen Marker getestet, z.B. wird die IL-2-Produktion gemessen.

Die in den Tests verwendeten T-Zellen werden unter für eine Vermehrung geeigneten Bedingungen inkubiert. Zum Beispiel wird ein DO11.10-T-Zell-Hybridom geeigneterweise bei etwa 37°C und 5% CO₂ im Vollmedium (RPMI 1640, supplementiert mit 10% FBS, Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin und 5 x 10⁻⁵ M 2-Mercaptoethanol) inkubiert. Serielle Verdünnungen des erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls können getestet werden. T-Zell-Aktivierungssignale werden durch Antigen-präsentierende Zellen bereitgestellt, die mit dem geeigneten antigenen Peptid beladen worden waren.

Alternativ zu der Messung eines exprimierten Proteins wie IL-2 kann die Modulation der T-Zell-Aktivierung geeigneter Weise durch Veränderungen der Vermehrung von Antigen-abhängigen T-Zellen, wie gemessen durch bekannte Radiomarkierungsverfahren, bestimmt werden. Zum Beispiel kann ein markiertes (wie tritiert) Nukleotid in ein Testkulturmedium eingebracht werden. Das Einbringen eines derartigen markierten Nukleotids in die DNA dient als Messgröße für die T-Zell-Vermehrung. Dieser Test ist nicht für T-Zellen geeignet, die keiner Antigen-Präsentation für das Wachstum bedürfen, wie T-Zell-Hybridome. Der Test ist für die Messung der Modulation von T-Zell-Aktivierung durch Fusionsmoleküle im Fall von nicht-transformierten T-Zellen, die aus Säugern isoliert wurden, geeignet.

- Die Fähigkeit eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls, eine Immunreaktion zu induzieren, einschließlich eine Vakzinierung gegen eine Zielerkrankung zu ermöglichen, kann einfach durch einen in vivo-Test
5 bestimmt werden. Zum Beispiel kann ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül oder eine dafür kodierende Nukleinsäure an einen Säuger wie eine Maus verabreicht werden und Blutproben aus dem Säuger zum Zeitpunkt der ersten Verabreichung und mehrfach in periodischen Zeiträumen danach (wie 1, 2, 5 und 8 Wochen nach Verabreichung des
10 Fusionsmoleküls oder der dafür kodierenden Nukleinsäure) entnommen werden. Serum wird aus den Blutproben gewonnen und auf das Auftreten von durch die Immunisierung entstandenen Antikörpern getestet. Antikörperkonzentrationen können bestimmt werden. Daneben können aus dem Blut bzw. aus lymphatischen Organen T-Lymphozyten isoliert werden und
15 funktionell auf Reaktivität gegen das Antigen bzw. von dem Antigen abgeleitete Epitope getestet werden. Alle dem Fachmann bekannten „Readout“-Systeme u.a. Proliferationsassay, Zytokinsekretion, zytotoxische Aktivität, Tetrameranalyse können hierbei verwendet werden.
- 20 Erfindungsgemäße Verfahren für die Induktion einer Immunreaktion, einschließlich der Vakzinierung eines Lebewesens gegen eine Zielerkrankung, können in Kombination mit bekannten Verfahren für die Induktion einer Immunreaktion verwendet werden. Zum Beispiel kann ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül oder eine dafür kodierende
25 Nukleinsäure an ein Lebewesen in einer Anordnung oder Kombination mit der Verabreichung einer Vakzine-Zusammensetzung verabreicht werden, um die gewünschte Wirkung einer derartigen Vakzine-Zusammensetzung zu verstärken oder zu verlängern.
- 30 Der Begriff „abgeleitet“ bedeutet erfindungsgemäß, dass ein bestimmter Gegenstand, insbesondere eine bestimmte Sequenz, in dem Objekt, von dem er abgeleitet ist, insbesondere einem Organismus oder Molekül, vorliegt. Im

Fall von Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen, insbesondere bestimmten Sequenzregionen, bedeutet „abgeleitet“ außerdem, dass die betreffende Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenz in Übereinstimmung mit den nachstehenden Definitionen von einer Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenz abgeleitet ist, die in dem Objekt vorliegt. Somit bedeutet der Begriff „von einem MHC-Molekül abgeleitete Sequenz oder Region“, dass die Sequenz oder Region in einem MHC-Molekül vorliegt oder von einer Sequenz oder Region, die in einem MHC-Molekül vorliegt, in Übereinstimmung mit den nachstehenden Definitionen abgeleitet ist.

Eine Nukleinsäure ist erfindungsgemäß vorzugsweise Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA). Nukleinsäuren umfassen erfindungsgemäß genomische DNA, cDNA, mRNA, rekombinant hergestellte und chemisch synthetisierte Moleküle. Eine Nukleinsäure kann erfindungsgemäß als einzelsträngiges oder doppelsträngiges und lineares oder kovalent kreisförmig geschlossenes Molekül vorliegen.

Eine von einer Nukleinsäuresequenz abgeleitete Sequenz oder der Begriff „von einer Nukleinsäuresequenz abgeleitete Sequenz“ betrifft erfindungsgemäß homologe Sequenzen und Derivate der ersteren Sequenz.

Homologe Nukleinsäuresequenzen weisen erfindungsgemäß mindestens 40%, insbesondere mindestens 50%, mindestens 60%, mindestens 70%, mindestens 80%, mindestens 90% und vorzugsweise mindestens 95%, mindestens 98 oder mindestens 99% Identität der Nukleotide auf.

Eine Nukleinsäure ist insbesondere dann zu einer anderen Nukleinsäure „homolog“, wenn die beiden Sequenzen der komplementären Stränge miteinander hybridisieren und ein stabiles Duplex eingehen können, wobei die Hybridisierung vorzugsweise unter Bedingungen erfolgt, die eine spezifische Hybridisierung zwischen Polynukleotiden erlauben (stringente Bedingungen). Stringente Bedingungen sind beispielsweise in Molecular

Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., Hrsg., 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 oder Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., Hrsg., John Wiley & Sons, Inc., New York, beschrieben und betreffen beispielsweise die
5 Hybridisierung bei 65°C in Hybridisierungspuffer (3,5 x SSC, 0,02% Ficoll, 0,02% Polyvinylpyrrolidon, 0,02% Rinderserumalbumin, 2,5mM NaH₂PO₄ (pH 7), 0,5% SDS, 2mM EDTA). SSC ist 0,15 M Natriumchlorid / 0,15 M Natriumcitrat, pH 7. Nach der Hybridisierung wird die Membran, auf die die DNA übertragen wurde beispielsweise in 2 x SSC bei Raumtemperatur und
10 sodann in 0,1 - 0,5 x SSC/ 0,1 x SDS bei Temperaturen bis 68°C gewaschen.

Mit „Derivat“ einer Nukleinsäure ist erfindungsgemäß gemeint, dass einzelne oder multiple Nukleotidsubstitutionen, -deletionen und/oder -additionen in der Nukleinsäure vorliegen. Weiterhin umfasst der Begriff „Derivat“ auch
15 eine chemische Derivatisierung einer Nukleinsäure an einer Base, einem Zucker oder Phosphat eines Nukleotids. Der Begriff „Derivat“ umfasst auch Nukleinsäuren, die nicht in der Natur vorkommende Nukleotide und Nukleotidanaloga enthalten.

20 Die erfindungsgemäß beschriebenen Nukleinsäuren sind vorzugsweise isoliert. Der Begriff „isolierte Nukleinsäure“ bedeutet erfindungsgemäß, dass die Nukleinsäure (i) in vitro amplifiziert wurde, zum Beispiel durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR), (ii) rekombinant durch Klonierung produziert wurde, (iii) gereinigt wurde, zum Beispiel durch Spaltung und
25 gelelektrophoretische Auftrennung, oder (iv) synthetisiert wurde, zum Beispiel durch chemische Synthese. Eine isolierte Nukleinsäure ist eine Nukleinsäure, die für eine Manipulierung durch rekombinante DNA-Techniken zur Verfügung steht.

30 Nukleinsäuren, die für Fusionsmoleküle kodieren, können erfindungsgemäß alleine oder in Kombination mit anderen Nukleinsäuren, insbesondere heterologen Nukleinsäuren, vorliegen. In bevorzugten Ausführungsformen

liegt eine Nukleinsäure funktionell in Verbindung mit Expressionskontrollsequenzen oder regulatorischen Sequenzen vor, die in Bezug zu der Nukleinsäure homolog oder heterolog sein können. Eine kodierende Sequenz und eine regulatorische Sequenz sind dann „funktionell“ miteinander verbunden, falls sie derart kovalent miteinander verknüpft sind, dass die Expression oder Transkription der kodierenden Sequenz unter der Kontrolle oder unter dem Einfluss der regulatorischen Sequenz steht. Falls die kodierende Sequenz in ein funktionelles Protein translatiert werden soll, führt bei einer funktionellen Verbindung einer regulatorischen Sequenz mit der kodierenden Sequenz eine Induktion der regulatorischen Sequenz zu einer Transkription der kodierenden Sequenz, ohne dass es zu einer Leserasterverschiebung in der kodierenden Sequenz oder zu einem Unvermögen der kodierenden Sequenz kommt, in das gewünschte Protein oder Peptid translatiert zu werden.

Der Begriff „Expressionskontrollsequenz“ oder „regulatorische Sequenz“ umfasst erfindungsgemäß Promotoren, Enhancer und andere Kontrollelemente, die die Expression eines Gens steuern. In bestimmten erfindungsgemäßen Ausführungsformen sind die Expressionskontrollsequenzen regulierbar. Die genaue Struktur von regulatorischen Sequenzen kann speziesabhängig oder zelltypusabhängig variieren, umfasst jedoch im Allgemeinen 5'-nicht-transkribierte und 5'-nicht-translatierte Sequenzen, die an der Initiation der Transkription bzw. Translation beteiligt sind wie TATA-Box, Capping-Sequenz, CAAT-Sequenz und ähnliches. Insbesondere umfassen 5'-nicht-transkribierte Regulationssequenzen eine Promotorregion, die eine Promotorsequenz für eine transkriptionelle Kontrolle des funktionell verbundenen Gens einschließt. Regulatorische Sequenzen können auch Enhancer-Sequenzen oder stromaufwärts gelegene Aktivatorsequenzen umfassen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Nukleinsäure erfindungsgemäß ein Vektor, gegebenenfalls mit einem Promotor, der die

Expression einer Nukleinsäure, z.B. einer Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kodiert, steuert. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Promoter ein T7-, T3- oder SP6-Promoter.

5 Der Begriff „Vektor“ wird dabei in seiner allgemeinsten Bedeutung verwendet und umfasst jegliche intermediären Vehikel für eine Nukleinsäure, die es z.B. ermöglichen, die Nukleinsäure in prokaryontische und/oder in eukaryontische Zellen einzubringen und gegebenenfalls in ein Genom zu integrieren. Solche Vektoren werden vorzugsweise in der Zelle repliziert und/oder exprimiert. Ein intermediäres Vehikel kann z.B. für den Gebrauch
10 bei der Elektroporation, beim Mikroprojektilbeschuss, bei der liposomalen Verabreichung, beim Transfer mit Hilfe von Agrobakterien oder bei der Insertion über DNA- oder RNA-Viren angepasst sein. Vektoren umfassen Plasmide, Phagemide, Bacteriophage oder Virusgenome.

15

Die Nukleinsäuren, die für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kodieren, können für eine Transfektion von Wirtszellen eingesetzt werden. Mit Nukleinsäuren ist dabei sowohl rekombinante DNA wie auch RNA gemeint. Rekombinante RNA kann durch in vitro-Transkription von einer DNA-
20 Matritze hergestellt werden. Sie kann des weiteren vor Applikation durch stabilisierende Sequenzen, Capping und Poly-Adenylierung modifiziert werden.

Der Begriff „Wirtszelle“ betrifft erfindungsgemäß jede Zelle, die mit einer
25 exogenen Nukleinsäure transformierbar oder transfizierbar ist. Der Begriff „Wirtszellen“ umfasst erfindungsgemäß prokaryontische (z.B. E. coli) oder eukaryontische (z.B. dendritische Zellen, B-Zellen, CHO-Zellen, COS-Zellen, K562-Zellen, Hefezellen und Insektenzellen). Besonders bevorzugt sind Säugerzellen wie Zellen aus Mensch, Maus, Hamster, Schwein, Ziege und
30 Primaten. Die Zellen können aus einer Vielzahl von Gewebetypen abgeleitet sein und umfassen primäre Zellen und Zelllinien. Spezifische Beispiele umfassen Keratinozyten, periphere Blutleukozyten, Stammzellen des

Knochenmarks und embryonale Stammzellen. In weiteren Ausführungsformen ist die Wirtszelle eine Antigen-präsentierende Zelle, insbesondere eine dendritische Zelle, ein Monozyt oder Makrophage. Eine Nukleinsäure kann in der Wirtszelle in einer einzigen oder in mehreren Kopien vorliegen und wird in einer Ausführungsform in der Wirtszelle exprimiert.

Der Begriff „Expression“ wird erfindungsgemäß in seiner allgemeinsten Bedeutung verwendet und umfasst die Produktion von RNA oder von RNA und Protein. Er umfasst auch eine teilweise Expression von Nukleinsäuren. Des weiteren kann die Expression transient oder stabil erfolgen. Bevorzugte Expressionssysteme in Säugerzellen umfassen pcDNA3.1 und pRc/CMV (Invitrogen, Carlsbad, CA), die einen selektierbaren Marker enthalten wie ein Gen, das eine Resistenz gegenüber G418 verleiht (und somit eine Selektion stabil transfizierter Zelllinien ermöglicht), und die Enhancer-Promotor-Sequenzen von Cytomegalovirus (CMV).

Eine für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kodierende Nukleinsäure kann auch eine Nukleinsäuresequenz umfassen, die für ein MHC-Molekül, vorzugsweise für ein HLA-Molekül kodiert. Die Nukleinsäuresequenz, die für ein MHC-Molekül kodiert, kann auf demselben Expressionsvektor wie die Nukleinsäure, die für das Fusionsmolekül kodiert, vorliegen oder beide Nukleinsäuren können auf verschiedenen Expressionsvektoren vorliegen. Im letzteren Fall können die beiden Expressionsvektoren in eine Zelle cotransfiziert werden.

Eine von einer Aminosäuresequenz abgeleitete Sequenz oder der Begriff „von einer Aminosäuresequenz abgeleitete Sequenz“ betrifft erfindungsgemäß homologe Sequenzen und Derivate der ersten Sequenz.

Homologe Aminosäuresequenzen weisen erfindungsgemäß mindestens 40%, insbesondere mindestens 50%, mindestens 60%, mindestens 70%,

mindestens 80%, mindestens 90% und vorzugsweise mindestens 95%, mindestens 98 oder mindestens 99% Identität der Aminosäurereste auf.

„Derivate“ eines Proteins oder Polypeptids oder einer Aminosäuresequenz im Sinne dieser Erfindung umfassen Aminosäure-Insertionsvarianten, Aminosäure-Deletionsvarianten und/oder Aminosäure-Substitutionsvarianten.

Aminosäure-Insertionsvarianten umfassen amino- und/oder carboxyterminale Fusionen, sowie Insertionen von einzelnen oder mehreren Aminosäuren in einer bestimmten Aminosäuresequenz. Bei Aminosäure-Sequenzvarianten mit einer Insertion werden ein oder mehrere Aminosäurereste in eine vorbestimmte Stelle in einer Aminosäuresequenz eingebracht, obwohl eine zufällige Insertion mit geeignetem Screening des resultierenden Produkts auch möglich ist. Aminosäure-Deletionsvarianten sind durch das Entfernen von einer oder mehreren Aminosäuren aus der Sequenz charakterisiert. Aminosäure-Substitutionsvarianten zeichnen sich dadurch aus, dass wenigstens ein Rest in der Sequenz entfernt und ein anderer Rest an dessen Stelle eingefügt wird. Vorzugsweise befinden sich die Modifikationen an Positionen in der Aminosäuresequenz, die zwischen homologen Proteinen oder Polypeptiden nicht konserviert sind. Vorzugsweise werden Aminosäuren durch andere mit ähnlichen Eigenschaften, wie Hydrophobizität, Hydrophilizität, Elektronegativität, Volumen der Seitenkette und ähnliches, ersetzt (konservative Substitution). Konservative Substitutionen betreffen beispielsweise den Austausch einer Aminosäure durch eine andere, wobei beide Aminosäuren in derselben nachstehenden Gruppe aufgeführt sind:

1. kleine aliphatische, nicht-polare oder leicht-polare Reste: Ala, Ser, Thr (Pro, Gly)
2. negativ geladene Reste und ihre Amide: Asn, Asp, Glu, Gln
3. positiv geladene Reste: His, Arg, Lys

4. große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val (Cys)
5. große aromatische Reste: Phe, Tyr, Trp.

5 Drei Reste sind aufgrund ihrer besonderen Rolle für die Proteinarchitektur in Klammern gesetzt. Gly ist der einzige Rest ohne eine Seitenkette und verleiht der Kette somit Flexibilität. Pro besitzt eine ungewöhnliche Geometrie, die die Kette stark einschränkt. Cys kann eine Disulfidbrücke bilden.

10 Die vorstehend beschriebenen Aminosäure-Varianten können leicht mit Hilfe von bekannten Peptidsynthesetechniken wie z.B. durch „Solid Phase Synthesis“ (Merrifield, 1964) und ähnliche Verfahren oder durch rekombinante DNA-Manipulation hergestellt werden. Techniken, um Substitutionsmutationen an vorbestimmten Stellen in DNA einzubringen, die eine bekannte oder teilweise bekannte Sequenz besitzt, sind gut bekannt
15 und umfassen z.B. M13-Mutagenese. Die Manipulation von DNA-Sequenzen zur Herstellung von Proteinen mit Substitutionen, Insertionen oder Deletionen und die allgemeinen rekombinanten Verfahren zur Expression von Proteinen z.B. in einem biologischen System (wie Säuger-, Insekten-, Pflanzen- und viralen Systeme) sind z.B. in Sambrook et. al. (1989)
20 ausführlich beschrieben.

„Derivate“ von Proteinen oder Polypeptiden umfassen erfindungsgemäß auch einzelne oder multiple Substitutionen, Deletionen und/oder Additionen jeglicher Moleküle, die mit dem Protein oder Polypeptid assoziiert sind, wie
25 Kohlenhydrate, Lipide und/oder Proteine oder Polypeptide.

In einer Ausführungsform umfassen „Derivate“ von Proteinen oder Polypeptiden diejenigen modifizierten Analoga, die durch Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Amidierung, Palmitoylierung,
30 Myristoylierung, Isoprenylierung, Lipidierung, Alkylierung, Derivatisierung, Einbringen von Schutz-/Blockierungsgruppen, proteolytische Spaltung oder Bindung an einen Antikörper oder an einen anderen zellulären Liganden

entstehen. Derivate von Proteinen oder Polypeptiden können auch durch andere Verfahren wie beispielsweise durch chemische Spaltung mit Bromcyan, Trypsin, Chymotrypsin, Papain, V8-Protease, NaBH₂, Acetylierung, Formylierung, Oxidation, Reduktion oder durch metabolische
5 Synthese in Gegenwart von Tunicamycin hergestellt werden.

Ferner erstreckt sich der Begriff „Derivat“ auch auf alle funktionellen chemischen Äquivalente der Proteine oder Polypeptide.

10 Die vorstehend beschriebenen Derivate von Proteinen und Polypeptiden sind erfindungsgemäß von dem Begriff „Fusionsmolekül“ umfasst, selbst wenn darauf nicht ausdrücklich verwiesen wird.

Die erfindungsgemäß beschriebenen pharmazeutischen
15 Zusammensetzungen können therapeutisch für die Behandlung einer bereits bestehenden Erkrankung oder prophylaktisch als Vakzinen für die Immunisierung eingesetzt werden.

Der Begriff „Vakzine“ betrifft erfindungsgemäß eine antigenische
20 Zubereitung, die beispielsweise ein Protein, ein Peptid, eine Nukleinsäure oder ein Polysaccharid umfasst und die an einen Empfänger verabreicht wird, um dessen humorales und/oder zelluläres Immunsystem gegenüber einem oder mehreren Antigenen zu stimulieren, die in der Vakzinezubereitung vorliegen. Die Begriffe „Vakzinierung“ oder
25 „Immunisierung“ betreffen den Vorgang einer Verabreichung einer Vakzine und der Stimulierung einer Immunreaktion gegenüber einem Antigen. Der Begriff „Immunreaktion“ betrifft die Aktivitäten des Immunsystems, einschließlich Aktivierung und Proliferation von spezifischen cytotoxischen T-Zellen nach Kontakt mit einem Antigen.

30

Tiermodelle können für ein Testen einer immunisierenden Wirkung z.B. gegenüber Krebs bei Verwendung eines Tumor-assoziierten Antigens als

Antigen eingesetzt werden. Dabei können beispielsweise menschliche Krebszellen in eine Maus für die Schaffung eines Tumors eingebracht werden und eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül, umfassend das Tumor-assoziiertes Antigen, kodiert, kann verabreicht werden. Die Wirkung auf die Krebszellen (beispielsweise Verringerung der Tumorgroße) kann als Maß für die Wirksamkeit einer Immunisierung durch die Nukleinsäure gemessen werden.

Als Teil der Zusammensetzung für eine Immunisierung werden ein oder mehrere Fusionsmoleküle mit einem oder mehreren Adjuvanzen für eine Induktion einer Immunreaktion oder eine Erhöhung einer Immunreaktion verabreicht. Ein Adjuvans ist eine Substanz, die in ein Antigen eingebaut oder gemeinsam mit diesem verabreicht wird und die Immunreaktion verstärkt. Adjuvanzen können die Immunreaktion durch Bereitstellen eines Antigen-Reservoirs (extrazellulär oder in Makrophagen), Aktivierung von Makrophagen und Stimulierung bestimmter Lymphozyten verstärken. Adjuvanzen sind bekannt und umfassen in nicht begrenzender Weise Monophosphoryl-Lipid-A (MPL, SmithKline Beecham), Saponine wie QS21 (SmithKline Beecham), DQS21 (SmithKline Beecham; WO 96/33739), QS7, QS17, QS18 und QS-L1 (So et al., Mol. Cells 7:178-186, 1997), unvollständiges Freundsches Adjuvans, vollständiges Freundsches Adjuvans, Vitamin E, Montanid, Alaun, CpG-Oligonukleotide (vgl. Krieg et al., Nature 374:546-9, 1995) und verschiedene Wasser-in-Öl-Emulsionen, die aus biologisch abbaubaren Ölen wie Squalen und/oder Tocopherol hergestellt werden. Vorzugsweise werden die Fusionsmoleküle in einem Gemisch mit DQS21/MPL verabreicht. Das Verhältnis von DQS21 zu MPL beträgt typischerweise etwa 1:10 bis 10:1, vorzugsweise etwa 1:5 bis 5:1 und insbesondere etwa 1:1. Für eine Verabreichung an den Menschen sind DQS21 und MPL typischerweise in einer Vakzine-Formulierung in einem Bereich von etwa 1 µg bis etwa 100 µg vorhanden.

Andere Stoffe, die eine Immunreaktion des Patienten stimulieren, können auch verabreicht werden. Zum Beispiel sind Zytokine bei einer Vakzinierung aufgrund ihrer regulatorischen Eigenschaften auf Lymphozyten verwendbar. Solche Zytokine umfassen z.B. Interleukin-12 (IL-12), von dem gezeigt wurde, dass es die schützenden Wirkungen von Vakzinen verstärkt (vgl. Science 268:1432-1434, 1995), GM-CSF und IL-18.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Induktion einer Immunreaktion in einem Säuger umfasst im Allgemeinen die Verabreichung einer wirksamen Menge eines erfindungsgemäßen Fusionsmoleküls und/oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure, insbesondere in Form eines Vektors. Vorzugsweise wird DNA oder RNA, die für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kodiert, an einen Säuger zusammen mit einer DNA-Sequenz verabreicht, die für einen T-Zell-co-stimulierenden Faktor kodiert, wie ein für B7-1 oder B7-2 kodierendes Gen.

Der Begriff „T-Zell-co-stimulierender Faktor“ betrifft hier ein Molekül, insbesondere ein Peptid, das zur Bereitstellung eines co-stimulierenden Signals fähig ist und dadurch eine Immunreaktion verstärkt, insbesondere die Vermehrung von T-Zellen in Gegenwart eines oder mehrerer erfindungsgemäßer Fusionsmoleküle aktiviert. Eine derartige Aktivierung der T-Zell-Vermehrung kann durch allgemein bekannte Tests bestimmt werden.

Diese Faktoren umfassen co-stimulierende Moleküle, die in Form von Proteinen oder Nukleinsäuren bereitgestellt werden. Solche co-stimulierenden Moleküle sind beispielsweise B7-1 und B7-2 (CD80 bzw. CD86), die auf dendritischen Zellen (DC) exprimiert werden und mit dem auf den T-Zellen exprimierten CD28-Molekül interagieren. Diese Interaktion stellt eine Co-Stimulierung (Signal 2) für eine Antigen/MHC/TCR-stimulierte (Signal 1) T-Zelle bereit, wodurch die Vermehrung der T-Zelle und die Effektorfunktion verstärkt wird. B7 interagiert auch mit CTLA4 (CD152) auf T-Zellen und Untersuchungen, die CTLA4- und B7-Liganden einbeziehen,

zeigen, dass die B7-CTLA4-Interaktion eine Antitumor-Immunität und CTL-Vermehrung verstärken kann (Zheng, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(11):6284-6289 (1998)).

- 5 B7 wird typischerweise nicht auf Tumorzellen exprimiert, so dass diese keine wirksamen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) für T-Zellen sind. Eine Induktion der B7-Expression würde ermöglichen, dass Tumorzellen wirksamer eine Vermehrung von cytotoxischen T-Lymphozyten und eine Effektorfunktion stimulieren. Eine Co-Stimulierung durch eine Kombination
10 von B7/IL-6/IL-12 zeigte eine Induktion des IFN-gamma- und Th1-Zytokin-Profiles in einer T-Zell-Population, was zu einer weiter verstärkten T-Zell-Aktivität führt (Gajewski et al., J. Immunol. 154:5637-5648 (1995)).

- Eine vollständige Aktivierung von cytotoxischen T-Lymphozyten und eine
15 vollständige Effektorfunktion erfordert eine Mitwirkung von T-Helferzellen durch die Interaktion zwischen dem CD40-Liganden auf den T-Helferzellen und dem CD40-Molekül, das von dendritischen Zellen exprimiert wird (Ridge et al., Nature 393:474 (1998), Bennett et al., Nature 393:478 (1998), Schönberger et al., Nature 393:480 (1998)). Der Mechanismus dieses co-
20 stimulierenden Signals betrifft wahrscheinlich die Steigerung der B7- und assoziierten IL-6/IL-12-Produktion durch die dendritischen Zellen (Antigen-präsentierenden Zellen). Die CD40-CD40L-Interaktion komplementiert so die Interaktionen des Signals 1 (Antigen/MHC-TCR) und des Signals 2 (B7-CD28).

- 25 Erfindungsgemäß vorgesehen ist eine Verabreichung von Nukleinsäuren, Polypeptiden oder Proteinen und/oder Zellen. Eine Verabreichung von DNA und RNA ist bevorzugt.

- 30 In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu dem nicht-modifizierten Antigen erfindungsgemäß eine 100-fach geringere Dosis des Impfstoffs ausreicht, um äquivalente oder stärkere Immunantworten zu

induzieren. Ein Problem bei der direkten Injektion von Nukleinsäure-Impfstoffen ist, dass die Dosis, die nötig ist, um Immunantworten zu induzieren, sehr hoch ist. Bei DNA-Impfstoffen ist die Ursache vermutlich hauptsächlich darin begründet, dass nur ein Bruchteil der Zellen injizierte DNA in den Kern aufnehmen. Bei RNA-Impfstoffen liegt das Problem vermutlich insbesondere darin, dass injizierte RNA sehr schnell durch RNAsen abgebaut wird.

Bei Verwendung der erfindungsgemäß modifizierten Impfstoffe ist zu erwarten, dass bei einer direkten Injektion von Nukleinsäuren, insbesondere RNA im Vergleich zu unmodifizierten Nukleinsäuren massiv höhere Immunantworten erhalten werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein viraler Vektor für die Verabreichung einer Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes Fusionsmolekül kodiert, aus der Gruppe ausgewählt bestehend aus Adenoviren, Adeno-assoziierten Viren, Poxviren, einschließlich Vacciniavirus und attenuierten Poxviren, Semliki-Forest-Virus, Retroviren, Sindbis-Virus und Ty-Virus-ähnlichen Partikeln. Besonders bevorzugt sind Adenoviren und Retroviren. Die Retroviren sind üblicherweise replikationsdefizient (d.h. sie sind unfähig, infektiöse Partikel zu erzeugen).

Verschiedene Verfahren können eingesetzt werden, um erfindungsgemäß Nukleinsäuren in Zellen in vitro oder in vivo einzubringen. Solche Verfahren umfassen die Transfektion von Nukleinsäure-Kalziumphosphat-Präzipitaten, die Transfektion von Nukleinsäuren, die mit DEAE assoziiert sind, die Transfektion oder Infektion mit den vorstehenden Viren, die die interessierenden Nukleinsäuren tragen, die Liposomen-vermittelte Transfektion und ähnliches. In bestimmten Ausführungsformen ist eine Steuerung der Nukleinsäure an bestimmte Zellen bevorzugt. In solchen Ausführungsformen kann ein Träger, der für die Verabreichung einer Nukleinsäure an eine Zelle (z.B. ein Retrovirus oder ein Liposom) eingesetzt

wird, ein gebundenes Zielsteuerungsmolekül aufweisen. Zum Beispiel kann ein Molekül wie ein Antikörper, der für ein Oberflächenmembran-Protein auf der Zielzelle spezifisch ist, oder ein Ligand für einen Rezeptor auf der Zielzelle in den Nukleinsäureträger eingebaut oder daran gebunden werden.

- 5 Falls eine Verabreichung einer Nukleinsäure durch Liposomen erwünscht ist, können Proteine, die an ein Oberflächenmembran-Protein binden, das mit der Endozytose assoziiert ist, in die Liposomenformulierung eingebaut werden, um eine Zielsteuerung und/oder Aufnahme zu ermöglichen. Solche Proteine umfassen Kapsid-Proteine oder Fragmente davon, die für einen
- 10 bestimmten Zelltyp spezifisch sind, Antikörper gegen Proteine, die internalisiert werden, Proteine, die eine intrazelluläre Stelle ansteuern, und ähnliches.

- Vorzugsweise werden die Nukleinsäuren zusammen mit stabilisierenden
- 15 Substanzen wie RNA-stabilisierenden Substanzen verabreicht.

- In einer Ausführungsform erfolgt die Verabreichung von Nukleinsäuren durch ex vivo-Verfahren, d.h. durch Entfernung von Zellen aus einem Patienten, genetische Veränderung der Zellen, und Wiedereinbringung der
- 20 veränderten Zellen in den Patienten. Dies umfasst im Allgemeinen das Einbringen einer funktionellen Kopie eines Gens in die Zellen eines Patienten in vitro und die Rückführung der genetisch veränderten Zellen in den Patienten. Die funktionelle Kopie des Gens steht unter funktioneller Kontrolle von regulatorischen Elementen, die eine Expression des Gens in
- 25 den genetisch veränderten Zellen erlauben. Transfektions- und Transduktionsverfahren sind dem Fachmann bekannt. Erfindungsgemäß vorgesehen ist auch eine Verabreichung von Nukleinsäuren in vivo durch die Verwendung von Vektoren wie Viren und zielgesteuerten Liposomen.

- 30 Eine Verabreichung von Polypeptiden und Peptiden kann in an sich bekannter Weise erfolgen.

Der Begriff „Patient“, „Individuum“ oder „Lebewesen“ bedeutet erfindungsgemäß Mensch, nicht menschlicher Primat oder ein anderes Tier, insbesondere Säugetier wie Kuh, Pferd, Schwein, Schaf, Ziege, Hund, Katze, Vögel wie Huhn oder Nagetier wie Maus und Ratte. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Patient, das Individuum oder das Lebewesen ein Mensch.

Die erfindungsgemäßen therapeutischen Zusammensetzungen können in pharmazeutisch verträglichen Zubereitungen verabreicht werden. Solche Zubereitungen können gewöhnlich pharmazeutisch verträgliche Konzentrationen von Salzen, Pufferstoffen, Konservierungstoffen, Trägern, ergänzenden immunitätssteigernden Stoffen wie Adjuvanzen (z.B. CpG-Oligonukleotide) und Zytokine und gegebenenfalls andere therapeutische Wirkstoffe enthalten.

Die erfindungsgemäßen therapeutischen Wirkstoffe können auf jedem herkömmlichen Weg verabreicht werden, einschließlich durch Injektion oder durch Infusion. Die Verabreichung kann beispielsweise oral, intravenös, intraperitoneal, intramuskulär, subkutan, intrakutan, transdermal, intralymphatisch, vorzugsweise durch Injektion in Lymphknoten, insbesondere Leistenlymphknoten, Lymphgefäße und/oder in die Milz, erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen werden in wirksamen Mengen verabreicht. Eine „wirksame Menge“ betrifft die Menge, die alleine oder zusammen mit weiteren Dosen eine gewünschte Reaktion oder eine gewünschte Wirkung erzielt. Im Fall einer Behandlung einer bestimmten Erkrankung oder eines bestimmten Zustands betrifft die gewünschte Reaktion die Hemmung des Krankheitsverlaufs. Dies umfasst die Verlangsamung des Fortschreitens der Erkrankung und insbesondere eine Unterbrechung des Fortschreitens der Erkrankung. Die gewünschte Reaktion bei einer Behandlung einer Erkrankung oder eines Zustands kann

auch die Verzögerung des Ausbruchs oder eine Verhinderung des Ausbruchs der Erkrankung oder des Zustands sein.

Eine wirksame Menge einer erfindungsgemäßen Zusammensetzung wird von dem zu behandelnden Zustand, der Schwere der Krankheit, den individuellen Parametern des Patienten, einschließlich Alter, physiologischer Zustand, Größe und Gewicht, der Dauer der Behandlung, der Art einer begleitenden Therapie (falls vorhanden), dem spezifischen Verabreichungsweg und ähnlichen Faktoren abhängen.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen sind vorzugsweise steril und enthalten eine wirksame Menge der therapeutisch wirksamen Substanz für die Erzeugung der gewünschten Reaktion oder der gewünschten Wirkung.

Die Dosen der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen, die verabreicht werden, können von verschiedenen Parametern wie der Verabreichungsart, dem Zustand des Patienten, dem gewünschten Verabreichungszeitraum, usw. abhängen. Für den Fall, dass eine Reaktion bei einem Patienten bei einer anfänglichen Dosis unzureichend ist, können höhere Dosen (oder effektiv höhere Dosen, die durch einen anderen, stärker lokalisierten Verabreichungsweg erzielt werden) eingesetzt werden.

Im Allgemeinen werden für eine Behandlung oder für eine Erzeugung oder Erhöhung einer Immunreaktion Dosen des Tumor-assoziierten Antigens von 1 ng bis 1 mg, vorzugsweise von 10 ng bis 100 µg formuliert und verabreicht. Falls die Verabreichung von Nukleinsäuren (DNA sowie RNA) erwünscht ist, werden Dosen von 1 ng bis 0,1 mg formuliert und verabreicht.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen werden im Allgemeinen in pharmazeutisch verträglichen Mengen und in pharmazeutisch verträglichen Zusammensetzungen verabreicht. Der Begriff

„pharmazeutisch verträglich“ betrifft ein nicht-toxisches Material, das nicht mit der Wirkung des aktiven Bestandteils der pharmazeutischen Zusammensetzung wechselwirkt. Solche Zubereitungen können gewöhnlich Salze, Pufferstoffe, Konservierungsstoffe, Träger und gegebenenfalls andere therapeutische Wirkstoffe enthalten. Bei einer Verwendung in der Medizin sollten die Salze pharmazeutisch verträglich sein. Nicht-pharmazeutisch verträgliche Salze können jedoch für die Herstellung pharmazeutisch verträglicher Salze davon verwendet werden und sind erfindungsgemäß umfasst. Solche pharmakologisch und pharmazeutisch verträglichen Salze umfassen in nicht begrenzender Weise diejenigen, die aus den nachstehenden Säuren hergestellt werden: Chlorwasserstoff-, Bromwasserstoff-, Schwefel-, Salpeter-, Phosphor-, Malein-, Essig-, Salicyl-, Citronen-, Ameisen-, Malon-, Bernsteinsäure und ähnliches. Pharmazeutisch verträgliche Salze können auch als Alkalimetall- oder Erdalkalimetallsalze wie Natrium-, Kalium- oder Calciumsalze hergestellt werden.

Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen. Der Begriff „pharmazeutisch verträglicher Träger“ betrifft erfindungsgemäß einen oder mehrere kompatible feste oder flüssige Füllstoffe, Verdünnungsmittel oder Kapselsubstanzen, die für eine Verabreichung an einen Menschen geeignet sind. Der Begriff „Träger“ betrifft einen organischen oder anorganischen Bestandteil, natürlicher oder synthetischer Natur, in dem der aktive Bestandteil kombiniert wird, um eine Anwendung zu erleichtern. Die Bestandteile der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung sind gewöhnlich derart, dass keine Interaktion auftritt, die die gewünschte pharmazeutische Wirksamkeit wesentlich beeinträchtigt.

Vorzugsweise sind die Trägerstoffe sterile Flüssigkeiten wie Wasser oder Öle, einschließlich derjenigen, die sich von Erdöl, Tieren oder Pflanzen ableiten oder synthetischen Ursprungs sind, wie z.B. Erdnussöl, Sojabohnenöl,

Mineralöl, Sesamöl, Sonnenblumenöl und dergleichen. Salzlösungen und wässrige Dextrose- und Glycerinlösungen können auch als wässrige Trägerstoffe verwendet werden.

- 5 Beispiele für Hilfs- und Trägerstoffe sind Acryl- und Methacrylderivate, Alginsäure, Sorbinsäurederivate wie α -Octadecyl- ω -hydroxypoly(oxyethylen)-5-sorbinsäure, Aminosäuren und deren Derivate, insbesondere Aminverbindungen wie Cholin, Lecithin und Phosphatidylcholin, Gummi arabicum, Aromastoffe, Ascorbinsäure, Carbonate wie beispielsweise
- 10 Natrium-, Kalium-, Magnesium- und Calciumcarbonat und -hydrogencarbonat, Hydrogenphosphate und Phosphate von Natrium, Kalium, Calcium und Magnesium, Carmellose-natrium, Dimeticon, Farbstoffe, Geschmacksstoffe, Puffersubstanzen, Konservierungsmittel, Verdickungsmittel, Weichmacher, Gelatine, Glucosesirupe, Malz,
- 15 hochdisperses Siliziumdioxid, Hydromellose, Benzoate, insbesondere Natrium- und Kaliumbenzoat, Macrogol, Magermilchpulver, Magnesiumoxid, Fettsäuren und deren Derivate und Salze wie Stearinsäure und Stearate, insbesondere Magnesium- und Calciumstearat, Fettsäureester sowie Mono- und Diglyceride von Speisefettsäuren, natürliche und künstliche Wachse wie
- 20 Bienenwachs, gelbes Wachs und Montanglycolwachs, Chloride, insbesondere Natriumchlorid, Polyvidon, Polyethylenglykole, Polyvinylpyrrolidon, Povidon, Öle wie Rizinusöl, Sojaöl, Kokosnussöl, Palmkernöl, Zucker und Zuckerderivate, insbesondere Mono- und Disaccharide wie Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Lactose, Maltose, Xylose, Saccharose,
- 25 Dextrose und Cellulose und deren Derivate, Schellack, Stärke und Stärkederivate, insbesondere Maisstärke, Talg, Talkum, Titandioxid, Weinsäure, Zuckeralkohole wie Glycerin, Mannit, Sorbit und Xylit und deren Derivate, Glykol, Ethanol und Gemische derselben.
- 30 Vorzugsweise können die pharmazeutischen Zusammensetzungen zusätzlich auch Benetzungsmittel, Emulgatoren und/oder pH-puffernde Mittel enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform können die pharmazeutischen Zusammensetzungen einen Resorptionsverstärker enthalten. Diese Resorptionsverstärker können, falls gewünscht, eine äquimolare Menge des Trägerstoffs in der Zusammensetzung ersetzen. Beispiele für solche Resorptionsverstärker umfassen in nicht begrenzender Weise Eucalyptol, N,N-Diethyl-m-toluamid, Polyoxyalkylenalkohole (wie Propylenglykol und Polyethylenglykol), N-Methyl-2-pyrrolidon, Isopropylmyristat, Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylacetamid (DMA), Harnstoff, Diethanolamin, Triethanolamin und dergleichen (siehe z.B. Percutaneous Penetration Enhancers, Hrsg. Smith et al. (CRC Press, 1995)). Die Menge an Resorptionsverstärker in der Zusammensetzung kann von den gewünschten zu erreichenden Wirkungen abhängen.

Ein Protease-Inhibitor kann in die erfindungsgemäße Zusammensetzung eingebaut werden, um einen Abbau eines Peptid- oder Proteinwirkstoffs zu vermeiden und dadurch die Bioverfügbarkeit zu erhöhen. Beispiele für Protease-Inhibitoren umfassen in nicht-begrenzender Weise Aprotinin, Leupepsin, Pepstatin, α 2-Makroglobulin und Trypsin-Inhibitor. Diese Inhibitoren können alleine oder in Kombination verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können mit einer oder mehreren Beschichtungen versehen sein. Vorzugsweise sind die festen oralen Darreichungsformen mit einer magensaftresistenten Beschichtung versehen oder liegen in Form einer magensaftresistenten, gehärteten Weichgelatine kapsel vor.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen können geeignete Pufferstoffe wie Essigsäure in einem Salz, Citronensäure in einem Salz, Borsäure in einem Salz und Phosphorsäure in einem Salz enthalten.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können auch gegebenenfalls geeignete Konservierungsstoffe wie Benzalkoniumchlorid, Chlorbutanol, Parabene und Thimerosal enthalten.

- 5 Die pharmazeutischen Zusammensetzungen werden gewöhnlich in einer einheitlichen Dosisform dargeboten und können in an sich bekannter Weise hergestellt werden. Erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzungen können beispielsweise in Form von Kapseln, Tabletten, Lutschpastillen, Lösungen, Suspensionen, Sirupen, Elixieren oder als
10 Emulsion vorliegen.

- Zusammensetzungen, die für eine parenterale Verabreichung geeignet sind, umfassen gewöhnlich eine sterile wässrige oder nicht-wässrige Zubereitung des Wirkstoffs, die vorzugsweise mit dem Blut des Empfängers isotonisch ist.
15 Verträgliche Träger und Lösungsmittel sind beispielsweise Ringer-Lösung und isotonische Natriumchloridlösung. Zusätzlich werden gewöhnlich sterile, fixierte Öle als Lösungs- oder Suspensionsmedium eingesetzt.

- Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele und
20 Figuren ausführlich beschrieben, die ausschließlich der Erläuterung dienen und nicht begrenzend zu verstehen sind. Dem Fachmann sind aufgrund der Beschreibung und der Beispiele weitere Ausführungsformen zugänglich, die nicht über den Rahmen der Erfindung und den Umfang der anhängenden Ansprüche hinausgehen.

25

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

- Abbildung 1: Schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins.** Das Fusionsprotein besteht aus einem N-terminal
30 gelegenen Sekretionssignal, einer C-terminal lokalisierten Transmembran- und cytoplasmatischen Domäne eines Histokompatibilitätsantigens und einer integrierten kompletten oder partiellen Sequenz eines Antigens.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Kassetten für die Expression von Fusionsproteinen. SP: Signalpeptid; MCS: multiple Klonierungsstelle; TM: Transmembrandomäne; MHC Tail: cytoplasmatischer Schwanz eines MHC-Moleküls; Antigen: Sequenz kodierend für ein Antigen, gegen das Immunantworten induziert werden sollen

Abbildung 3: Testen der Auswirkung unterschiedlicher RNA-Dosen auf die Frequenz antigenspezifischer CD4+-T-Lymphozyten.

1 x 10⁶ aufgereinigte CD4+-Lymphozyten wurden über 1 Woche mit 2 x 10⁵ DC kokultiviert, welche mit RNA in den angegebenen Mengen (0,1-10 µg RNA) per Elektroporation transfiziert worden waren. Am Tag 7 nach Stimulation wurde ein ELISPOT unter Standardbedingungen zum Nachweis Interferon-gamma-sezernierender T-Lymphozyten durchgeführt. Als Antigen-präsentierende Zellen wurden DC desselben Spenders, die mit überlappenden pp65-Peptiden (1,75 µg/ml) oder einem irrelevanten Kontrollpeptid beladen worden waren, verwendet. Für den Test wurden 3 x 10⁴ Effektoren mit 2 x 10⁴ DC für 16 h koinkubiert. Nach Standardentwicklung wurde die Anzahl der IFN-gamma-sezernierenden T-Lymphozyten mittels einer Software-basierten Videoauswertung bestimmt. Im Vergleich zu der CMVpp65standard-RNA zeigt sich eine massive Expansion von CD4+-Lymphozyten sowohl durch das CMVpp65-TM1- als auch durch das CMVpp65-TM2-Konstrukt.

Abbildung 4: Testen der Auswirkung unterschiedlicher RNA-Dosen auf die Frequenz Interferon-gamma-sezernierender CD8+-T-Lymphozyten. 1 x 10⁶ aufgereinigte CD8+-Lymphozyten wurden über 1 Woche mit 2 x 10⁵ DC kokultiviert, welche mit RNA in den angegebenen Mengen (0,1-10 µg RNA) per Elektroporation transfiziert worden waren. Am Tag 7 wurde ein Standard ELISPOT zum Nachweis IFN-gamma-sezernierender T-Lymphozyten gegen DC desselben Spenders durchgeführt, welche mit überlappenden pp65-Peptiden (1,75 µg/ml) oder einem irrelevanten

Kontrollpeptid beladen worden waren. Es wurden 3×10^4 Effektoren mit 2×10^4 DC für 16 h koinkubiert. Nach Standardentwicklung wurde die Anzahl der IFN-gamma-sezernierenden T-Lymphozyten mittels einer Software-basierten Videoauswertung bestimmt. Es zeigte sich eine massive Expansion von CD8+-Lymphozyten durch das CMVpp65-TM1- und das CMVpp65-TM2-Konstrukt. Selbst bei Verwendung von 100x geringeren Dosen ($0,1 \mu\text{g}$ RNA) liegt die Frequenz der pp65-spezifischen CD8+-Lymphozyten noch über dem Hintergrund nach Stimulation durch mit NYESO-RNA transfizierten DC (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation durch das CMVpp65standard-Konstrukt zeigte erst ab $2,5 \mu\text{g}$ eine Expansion von pp65-spezifischen Lymphozyten über das Niveau des Hintergrunds hinaus.

Abbildung 5: Dosis/Wirkungs-Profil für die Expansionskapazität verschiedener Immunogene auf Antigen-spezifische Lymphozyten. Die erfindungsgemäß modifizierten Immunogene weisen eine deutlich gesteigerte Potenz ($>100x$) und eine höhere maximale Wirkung auf.

Abbildung 6: Vergleichender Test der Auswirkung von erfindungsgemäß modifizierten Immunogenen und Standardimmunogenen auf die Generierung von cytotoxischen Immunantworten. 1×10^6 aufgereinigte CD8+-Lymphozyten wurden über 1 Woche mit 2×10^5 DC kokultiviert, welche mit $10\mu\text{g}$ RNA per Elektroporation transfiziert worden waren. Am Tag 7 wurde ein Standard Cytochrom-Cytotoxizitätstest gegen DC desselben Spenders durchgeführt, welche mit unterschiedlichen Konzentrationen überlappender pp65-Peptide oder einem irrelevanten Kontrollpeptid beladen worden waren. Es wurden 15×10^4 Effektoren mit $0,5 \times 10^4$ DC für 4 h koinkubiert. Nach Messung des Überstandes im Counter wurde die spezifische Lyse berechnet, gemäß der Formel: Es zeigte sich eine starke Lyse durch CD8+-Lymphozyten, welche mit CMVpp65-TM1- und CMVpp65-TM2-Konstrukten stimuliert worden waren, die bis zu einer Konzentration von 10 nM des pp65-Peptid-Gemisches über dem Wert für das Kontrollpeptid lag (Daten nicht gezeigt). Durch das pp65-Peptid-Gemisch

wurden ebenfalls CD8⁺-Lymphozyten expandiert, die eine deutliche spezifische Lyse zeigten, aber nicht das Niveau von CMVpp65-TM1 und -TM2 erreichten. Durch das CMVpp65standard-Konstrukt konnte nur eine schwache Stimulation pp65-spezifischer cytotoxischer T-Zellen erreicht werden.

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Kassetten für die Expression von Fusionsproteinen. CS: Klonierungsstelle; TM: Transmembrandomäne; SNARE: SNARE-Protein oder -Motiv; Antigen: Sequenz kodierend für ein Antigen, gegen das Immunantworten induziert werden sollen

Abbildung 8: In den Beispielen verwendete Sequenzen HLA-Klasse I-TM-CM: Transmembran-cytoplasmatische Region eines HLA-Klasse I-Moleküls; HLA-Klasse II-TM-CM: Transmembran-cytoplasmatische Region eines HLA-Klasse II-Moleküls

Abbildung 9: Sequenzen von Transmembran-cytoplasmatischen Regionen bzw. cytoplasmatischen Regionen von MHC-Molekülen. Die Sequenzen zeigen die Transmembran-cytoplasmatische Region bzw. nur die cytoplasmatische Region verschiedener HLA Moleküle. Die Transmembranregion ist unterstrichen und fett

Abbildung 10: Sequenzen von SNARE-Proteinen. Diese Sequenzen sind für eine Konstruktion der erfindungsgemäßen SNARE-Antigen-Fusionsmoleküle (N-SNARE-Antigen) geeignet

Abbildung 11: Stimulation naiver CD8⁺-T-Lymphozyten durch erfindungsgemäße Fusionskonstrukte. In Mikrotiterplatten wurden pro Well 1×10^5 CD8⁺-Lymphozyten gegen 2×10^4 DC, welche mit 20 μ g CMVpp65-TM1 oder Kontroll-RNA transfiziert waren, stimuliert. Das Medium wurde mit IL-6 (1000 U/ml) und IL-12 (10 ng/ml) supplementiert. Am Tag +7 und +14 wurde mit aufgetauten transfizierten DC (2×10^4 / Well)

restimuliert, wobei das Medium IL-2 (10 U/ml) und IL-7 (5 ng/ml) enthielt.
Am Tag +21 wurden alle Populationen im ELISpot gegen Kontroll-Peptide
(1,75µg/ml) und gegen pp65-überlappende Peptide (1,75µg/ml) getestet.
Zwei der gegen CMVpp65-TM1 stimulierten Populationen (Pop.1, Pop.2)
5 zeigten eine deutliche pp65-Reaktivität.

Beispiele:

Beispiel 1: Herstellung der modifizierten Vakzine

Für die Herstellung der modifizierten Vakzine wurde zunächst in einem
Expressionsvektor, welcher die Transkription von RNA erlaubt, eine Kassette
hergestellt, die die Expression von Fusionsgenen erlaubt. Hierfür wurde
zunächst die Nukleinsäure, die für ein Signalpeptid eines HLA-Moleküls
15 kodiert, aus menschlichen Lymphozyten amplifiziert und das Fragment als
cDNA in einen Vektor kloniert (SEQ ID NO: 1 und 2). Die Klonierung wurde
so durchgeführt, dass hinter der cDNA des Signalpeptids verschiedene
Restriktionsenzym-Schnittstellen lagen und sich weitere Fragmente „in-
frame“ in die Expressionskassette klonieren lassen. Als Vektoren wurden
20 Plasmide ausgewählt, die über einen 5'-gelegenen RNA-Polymerase-Promoter
T3, T7 bzw. SP6 eine in vitro-Expression von RNA erlauben. Als nächstes
Fragment wurde eine cDNA in diesen Vektor kloniert, welche eine
Transmembrandomäne und die cytoplasmatische Domäne eines HLA-Klasse
I (SEQ ID NO: 3 und 4) bzw. eines Klasse II (SEQ ID NO: 5 und 6) Moleküls,
25 einschließlich Stop-Codon kodiert. Die Klonierung wurde so durchgeführt,
dass das entstehende Plasmid zwischen den beiden Fragmenten noch
Restriktionsenzym-Schnittstellen zur Klonierung von Antigenen (SEQ ID NO:
7 und 8 und Abbildung 1) aufweist. In diese Expressionskassetten wurde als
Modellantigen die für das humane Cytomegalovirus Phosphoprotein 65
30 (pp65) kodierende Sequenz (SEQ ID NO: 9 und 10) so einkloniert, dass ein
durchgehender ORF aus HLA-Signalsequenz, pp65 und HLA-
Transmembran- und cytoplasmatischer Domäne (SEQ ID NO: 11 und 12)

entstand. Für Kontrollexperimente wurde ein Vektor hergestellt, der die pp65-Sequenz mit einem STOP-Codon in demselben Ausgangsvektor ohne die besagten Fragmente enthielt. Für die weitergehenden Experimente wurden folgende Nukleinsäuren genutzt:

CMVpp65standard: unmodifizierte CMVpp65-Sequenz, Standard-immunogen

CMVpp65-TM1: Fusionsnukleinsäure aus folgenden Fragmenten: HLA-Klasse I-Sekretionssignal, pp65-ORF und HLA-Klasse I-Transmembran- und cytoplasmatische Domäne (modifiziertes Immunogen).

CMVpp65-TM2: Fusionsnukleinsäure aus folgenden Fragmenten: HLA-Klasse I-Sekretionssignal, pp65-ORF und HLA-Klasse II-Transmembran- und cytoplasmatische Domäne (modifiziertes Immunogen).

Beispiel 2: Testen der modifizierten Vakzine

Die drei Nukleinsäuren (CMVpp65standard, CMVpp65TM1, CMVpp65TM2) wurden als Immunogen in Stimulationsversuchen mit autologen DC's antigenpositiver Spender eingesetzt. Um CD4- und CD8-Immunantworten getrennt zu testen, wurden aufgereinigte CD4+- und CD8+-Lymphozyten genutzt. Als Read-Out wurde der Enzyme-linked-Immuno-Spot-Assay (ELISPOT) eingesetzt, der als Standardtest zur Quantifizierung IFN- λ -sezernierender T-Zellen, anerkannt ist. Zum Testen der Effektorfunktion von CD8+-T-Lymphozyten wurde ein Standard-Chrom-Freisetzungstest benutzt. Autologe Monozyten oder DC's wurden mit pp65-RNA, CMVpp65-TM1- und CMVpp65-TM2-Immunogenen transfiziert. Als Maximal-Stimulationskontrolle wurden DC's mit überlappenden Peptiden für pp65 sowie mit Kontrollpeptid beladen. Die so behandelten DC's wurden über Nacht oder für 7 Tage mit CD4+- oder CD-8+-Lymphozyten koinkubiert. Das Read-Out erfolgte gegen autologe Monozyten oder DC's, die mit pp65-

überlappenden Peptiden oder einem CMV-Fibroblastenlysat gepulst worden waren. Bei der Untersuchung von CD4+-Immunantworten zeigte sich überraschenderweise, dass beide modifizierten Immunogene (CMVpp65-TM1 und CMVpp65-TM2) nicht nur eine gegenüber dem CMVpp65standard-
5 Immunogen verstärkte Immunantwort auslösten, sondern auch eine maximal starke antigenspezifische IFN-gamma-Sekretion bei CD4+-Lymphozyten induzierten (Abbildung 3). Der Prozentsatz der antigenspezifischen CD4+-Zellen nach Stimulation durch die modifizierten pp65-Konstrukte war dabei gleich oder sogar höher als nach Stimulation mit
10 pp65-überlappenden Peptiden. Wie erwartet, zeigte das CMVpp65standard-Immunogen keine relevante Stimulation von CD4+-Lymphozyten.

Ein noch überraschenderes Ergebnis ergab sich bei der Untersuchung von CD8-Immunantworten nach Stimulation mit den Immunogenen. Es ließ sich
15 zeigen, dass die Verwendung der modifizierten Expressionskassetten zur Stimulation von CD8+-Lymphozyten ebenfalls zu einem Anteil spezifisch IFN- λ -sezernierender Zellen führte, welcher dem nach Stimulation mit pp65-überlappenden Peptiden vergleichbar ist. Überraschenderweise waren auch hierbei die modifizierten RNA-Konstrukte den unveränderten
20 CMVpp65standard-Immunogenen weit überlegen (Abbildungen 4 und 5). Die Ergebnisse im Zytotoxizitätsassay zeigten, dass beide Modifikationen zur einer bisher noch nicht beschriebenen drastischen Erhöhung der Cytotoxizität im Vergleich zu CMVpp65standard-RNA führten (Abbildung 6). Auch hierbei zeigte sich überraschenderweise eine Überlegenheit der
25 modifizierten Immunogene gegenüber den überlappenden pp65-Peptiden.

Beispiel 3: Stimulation naiver CD8⁺-T-Lymphozyten durch HLA-Fusionsantigene

30 Um die Möglichkeit des Priming und der nachfolgenden Expansion von naiven CD8⁺-Lymphozyten durch die erfindungsgemäßen Fusionskonstrukte zu testen, wurden dendritische Zellen eines CMV-negativen Spenders mit

RNA des unmodifizierten CMVpp65, oder mit CMVpp65-TM1-RNA bzw. mit einer Kontroll-RNA (NY-Eso-1) transfiziert. Die transfizierten dendritischen Zellen wurden zur Stimulation von autologen CD8⁺-Lymphozyten eingesetzt. Es wurden 2 Restimulationen in wöchentlichem Abstand mit eingefrorenen transfizierten dendritischen Zellen durchgeführt. Zum Read-Out wurden am Tag +21 nach der ersten Stimulation alle Zell-Populationen in einem IFN γ -ELISpot Assay gegen autologe dendritische Zellen getestet, welche entweder mit pp65-überlappenden Peptiden oder zur Kontrolle mit irrelevanten überlappenden Peptiden beladen waren. Hierbei wurde festgestellt, dass durch die Stimulation mit CMVpp65-TM1-RNA in zwei Fällen pp65-reaktive CD8⁺-T-Lymphozyten-Populationen generiert wurden (Abbildung 11). Stimulationen mit der dendritischen Zellen, die mit der unmodifizierten CMVpp65 RNA bzw. mit Kontroll-RNA transfizierte wurden, wiesen dagegen keine signifikante pp65-Reaktivität auf.

Beispiel 4: Nutzung von HLA-Fusionsantigenen zur Stimulation von tumorzellreaktiven T-Lymphozyten

Um CD8⁺- und CD4⁺-T-Lymphozyten gegen definierte Tumorantigene expandieren zu können, wurden folgende Antigensequenzen als Inserts in erfindungsgemäße Fusionskonstrukte kloniert: das Tumorantigen TPTE (Koslowski et al., 2004, PMID 15342378), das Tumorantigen PRAME (Ikeda et al., 1997, PMID 9047241) in der Variante 1 (SEQ ID NO: 64), das Tumorantigen WT1 als Variante C (SEQ ID NO: 65) sowie das Tumorantigen p53 (SEQ ID NO: 66). Für die funktionelle Validierung wurden humane dendritische Zellen eines HLA* A 0201-positiven Spenders entweder mit WT1-HLA-TM1-RNA, mit unmodifizierter WT1-RNA oder irrelevanter Kontroll-RNA transfiziert und als Targetzellen benutzt. Nach Koinkubation mit WT1-reaktiven CD8⁺-T-Zellklonen für 8 oder 16 Stunden wurde IFN γ im Überstand quantifiziert. Es zeigte sich, dass nach Koinkubation mit WT1-HLA-TM1-transfizierten dendritischen Zellen die Sekretion um einen Faktor

6-9 höher lag im Vergleich zur Koinkubation nach Transfektion mit unmodifiziertem WT1.

5 In einer Serie von Experimenten wurden zusammenfassend mehrfach bestätigt folgende Resultate erzielt:

- Die modifizierten Immunogene führen zu einer deutlich verstärkten Stimulation und Expansion von Antigen-spezifischen CD4+-Lymphozyten
10 (gesteigerte Vermehrung von CD4+-Lymphozyten)
- Die modifizierten Immunogene führen zu einer deutlich verstärkten Stimulation und Expansion von Antigen-spezifischen CD8+-Lymphozyten (gesteigerte Vermehrung von CD8+-Lymphozyten)
15
- Die modifizierten Immunogene führen zu einer deutlich verstärkten Zytokinausschüttung von Antigen-spezifischen CD4+-Lymphozyten und CD8+-Lymphozyten (gesteigerte Zytokinausschüttung=gesteigerte Aktivierung)
20
- Die modifizierten Immunogene führen zu einer deutlich verstärkten cytotoxischen Reaktivität von Antigen-spezifischen CD8+-Lymphozyten (gesteigerter zytotoxischer Effekt)
- 25 • Die modifizierten Immunogene sind 100x potenter bezüglich der Expansion von Antigen-spezifischen CD8+-Lymphozyten
- Die modifizierten Immunogene haben selbst bei 100x niedrigerer Dosis einen stärkeren Effekt auf die Expansion von Antigen-spezifischen CD4+-
30 Lymphozyten als Standard-Immunogene

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die erfindungsgemäßen Modifikationen eines Antigens in einer über 100-fach gesteigerten Potenz (Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve) und einer drastisch erhöhten biologischen Wirksamkeit resultieren. Im Vergleich mit den bisher üblichen
5 unmodifizierten Antigensequenzen lässt sich ein Immunogen generieren, das als Vakzine eine quantitativ und qualitativ höhere Wirksamkeit besitzt.

Ein wichtiges Resultat der Erfindung ist, dass gleichzeitig antigenspezifische CD4+- und CD8+-Lymphozyten optimal stimuliert und expandiert werden.
10 Für die Wirksamkeit besonders von therapeutischen Vakzinen ist eine Stimulation der CD8+- und CD4+-Lymphozyten von entscheidender Bedeutung.

Patentansprüche

1. Fusionsmolekül, das ein Antigen, eine Transmembranregion und die cytoplasmatische Region einer Kette eines MHC-Moleküls umfasst.
5
2. Fusionsmolekül nach Anspruch 1, wobei das Fusionsmolekül keine Bindedomäne einer Kette eines MHC-Moleküls umfasst.
3. Fusionsmolekül nach Anspruch 1 oder 2, wobei die
10 Transmembranregion von einem MHC-Molekül abgeleitet ist.
4. Fusionsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Transmembranregion und cytoplasmatische Region eine Sequenz umfassen, die der Transmembranregion in Verbindung mit der cytoplasmatischen
15 Region eines MHC-Moleküls entspricht.
5. Fusionsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Fusionsmolekül zusätzlich eine Leitsequenz umfasst.
- 20 6. Fusionsmolekül nach Anspruch 5, wobei die Leitsequenz von einem MHC-Molekül abgeleitet ist.
7. Fusionsmolekül nach Anspruch 5 oder 6, wobei das Fusionsmolekül folgende Anordnung aufweist: N-Terminus-Leitsequenz / Antigen /
25 Transmembranregion / cytoplasmatische Region-C-Terminus, wobei die einzelnen Regionen gegebenenfalls durch Linkersequenzen voneinander getrennt sein können.
8. Fusionsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Antigen
30 mehrere Antigene umfasst.

9. Nukleinsäure, die für ein Fusionsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 8 kodiert.

10. Wirtszelle, die eine Nukleinsäure nach Anspruch 9 umfasst.

11. Pharmazeutische Zusammensetzung, die ein oder mehrere Fusionsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder eine oder mehrere Nukleinsäuren nach Anspruch 9 und/oder eine oder mehrere Wirtszellen nach Anspruch 10 umfasst.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11 in Form einer Vakzine.

13. Verfahren zur Erhöhung der Menge an MHC/Peptid-Komplexen in einer Zelle, wobei das Verfahren die Bereitstellung eines oder mehrerer Fusionsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder einer oder mehrerer Nukleinsäuren nach Anspruch 9 für die Zelle umfasst.

14. Verfahren zur Steigerung der Präsentation von Zelloberflächenmolekülen auf Zellen, die in der Lage sind, Antigene zu präsentieren, insbesondere B-Zellen und Makrophagen, wobei das Verfahren die Bereitstellung eines oder mehrerer Fusionsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder einer oder mehrerer Nukleinsäuren nach Anspruch 9 für die Zellen umfasst.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, wobei die Erhöhung der Menge an MHC/Peptid-Komplexen oder Steigerung der Präsentation von Zelloberflächenmolekülen ihrerseits die primäre Aktivierung von T-Zellen, insbesondere von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten, die gegenüber dem Antigen reagieren, verstärkt.

16. Verfahren zum Auslösen einer Immunreaktion bei einem Lebewesen, wobei das Verfahren die Verabreichung eines oder mehrerer Fusionsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder einer oder mehrerer Nukleinsäuren nach Anspruch 9 und/oder einer oder mehrerer Wirtszellen nach Anspruch 10 an das Lebewesen umfasst.

17. Verfahren zur Stimulierung oder Aktivierung von T-Zellen, insbesondere CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten, vorzugsweise in einem Lebewesen, wobei das Verfahren die Bereitstellung für die T-Zellen bzw. Verabreichung an das Lebewesen eines oder mehrerer Fusionsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder einer oder mehrerer Nukleinsäuren nach Anspruch 9 und/oder einer oder mehrerer Wirtszellen nach Anspruch 10 umfasst.

18. Verfahren zur Behandlung, Vakzinierung oder Immunisierung eines Lebewesens, wobei das Verfahren die Verabreichung eines oder mehrerer Fusionsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder einer oder mehrerer Nukleinsäuren nach Anspruch 9 und/oder einer oder mehrerer Wirtszellen nach Anspruch 10 an das Lebewesen umfasst.

Abb. 1

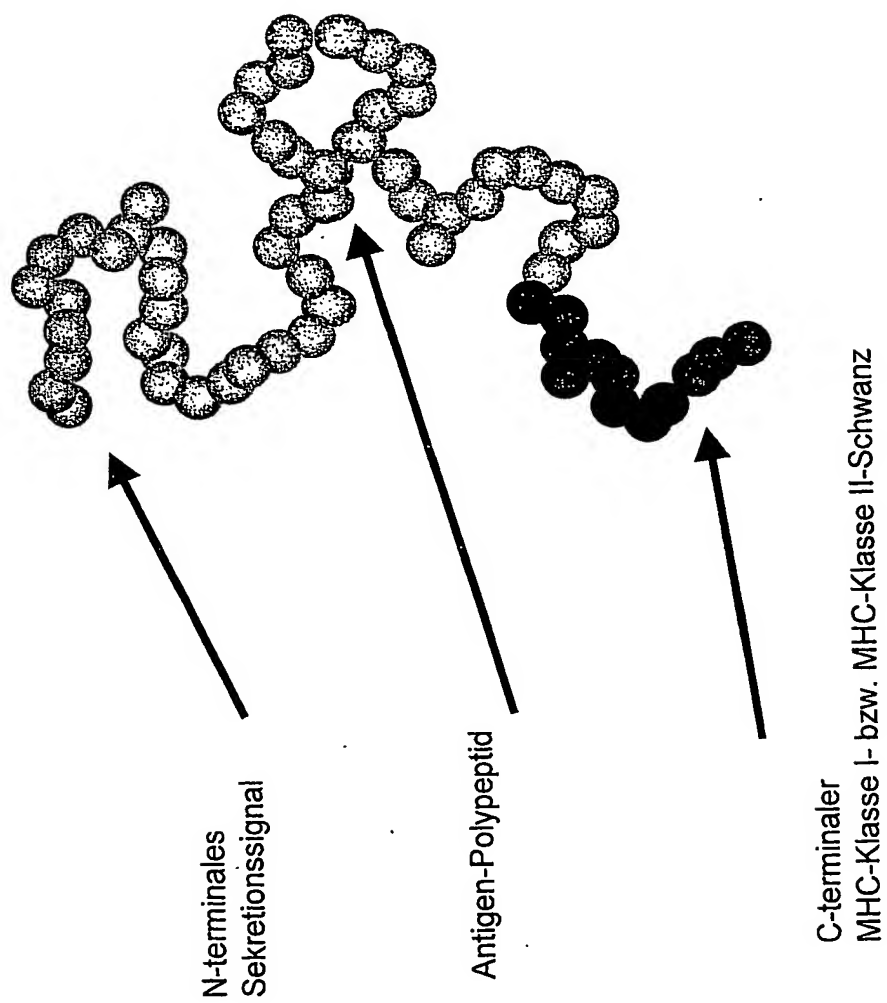
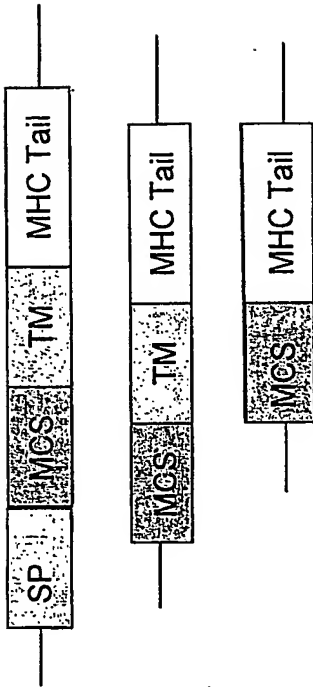
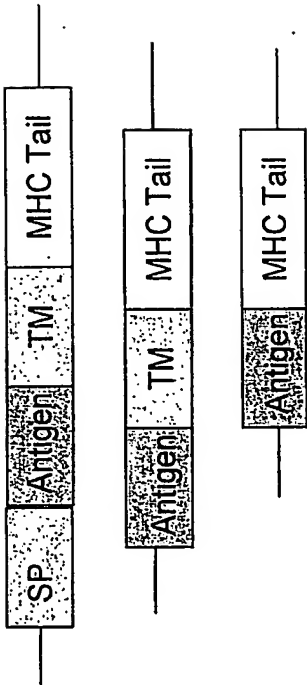


Abb. 2

Kassetten mit Klonierungsstellen (MCS) zur Expression von erfindungsgemäßen MHC-Fusionsproteinen



Kassetten mit einklonierten Antigenen zur Expression von erfindungsgemäßen MHC-Fusionsproteinen



BEST AVAILABLE COPY

Abb. 3

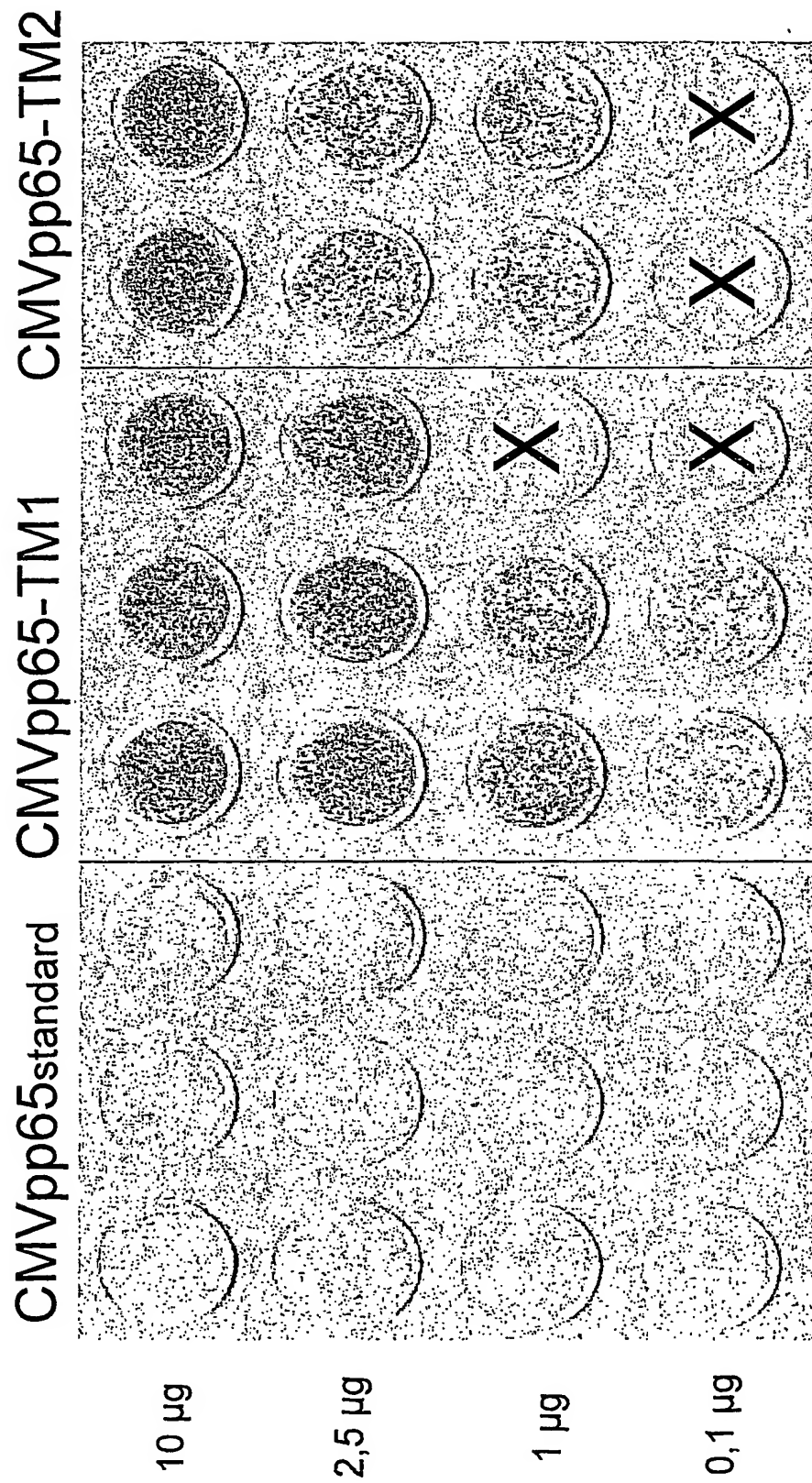


Abb. 4

BEST AVAILABLE COPY

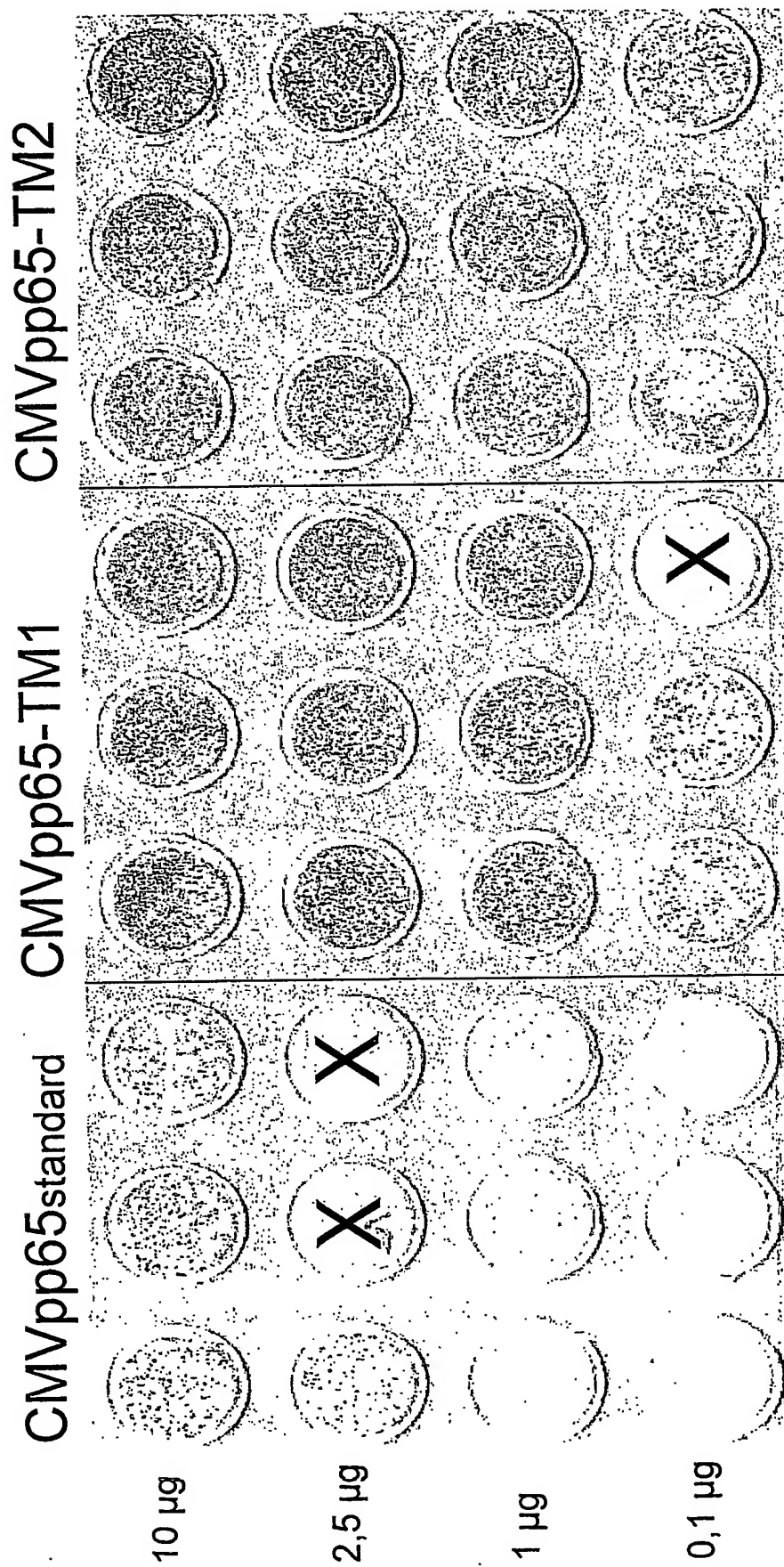


Abb. 5

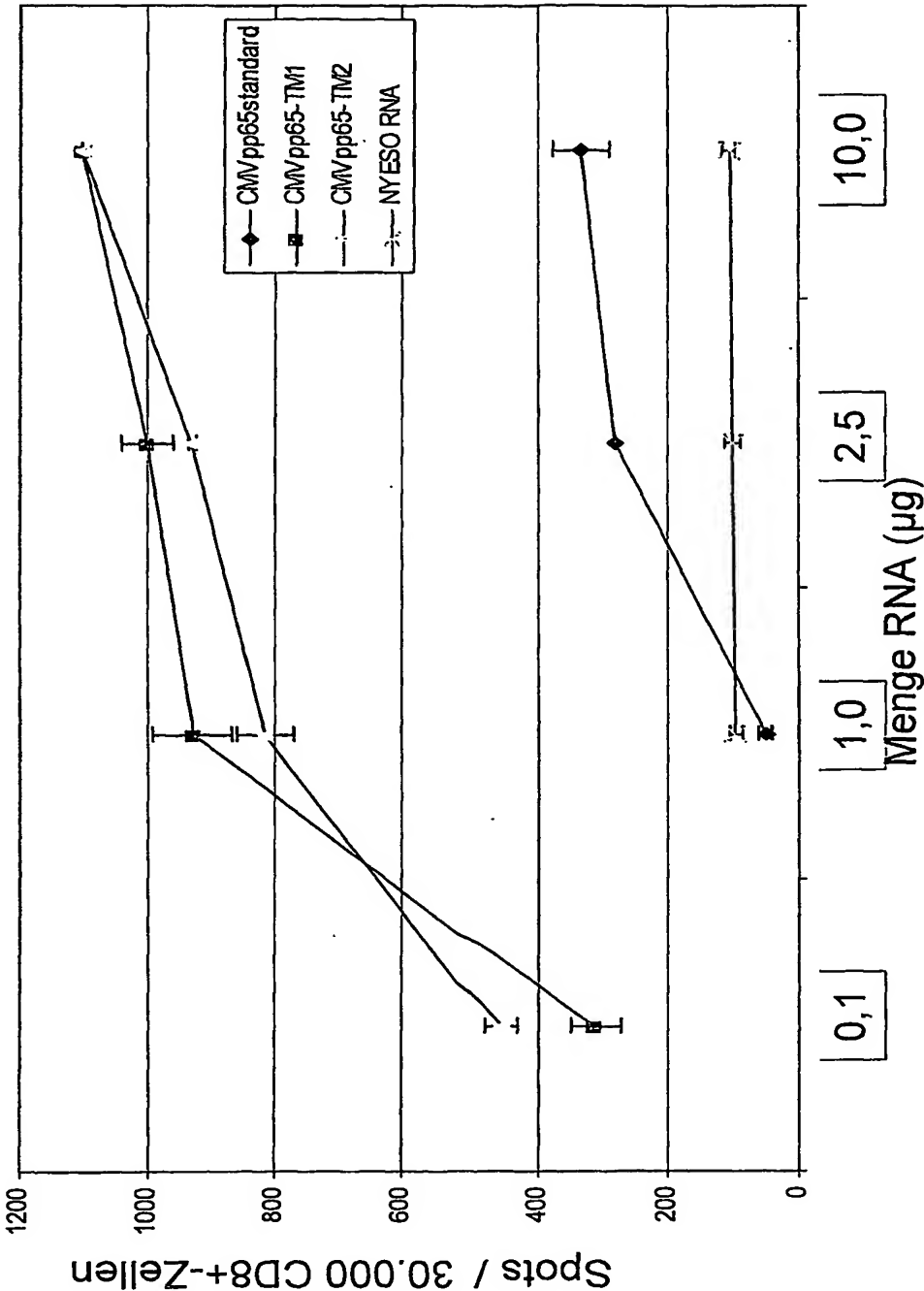
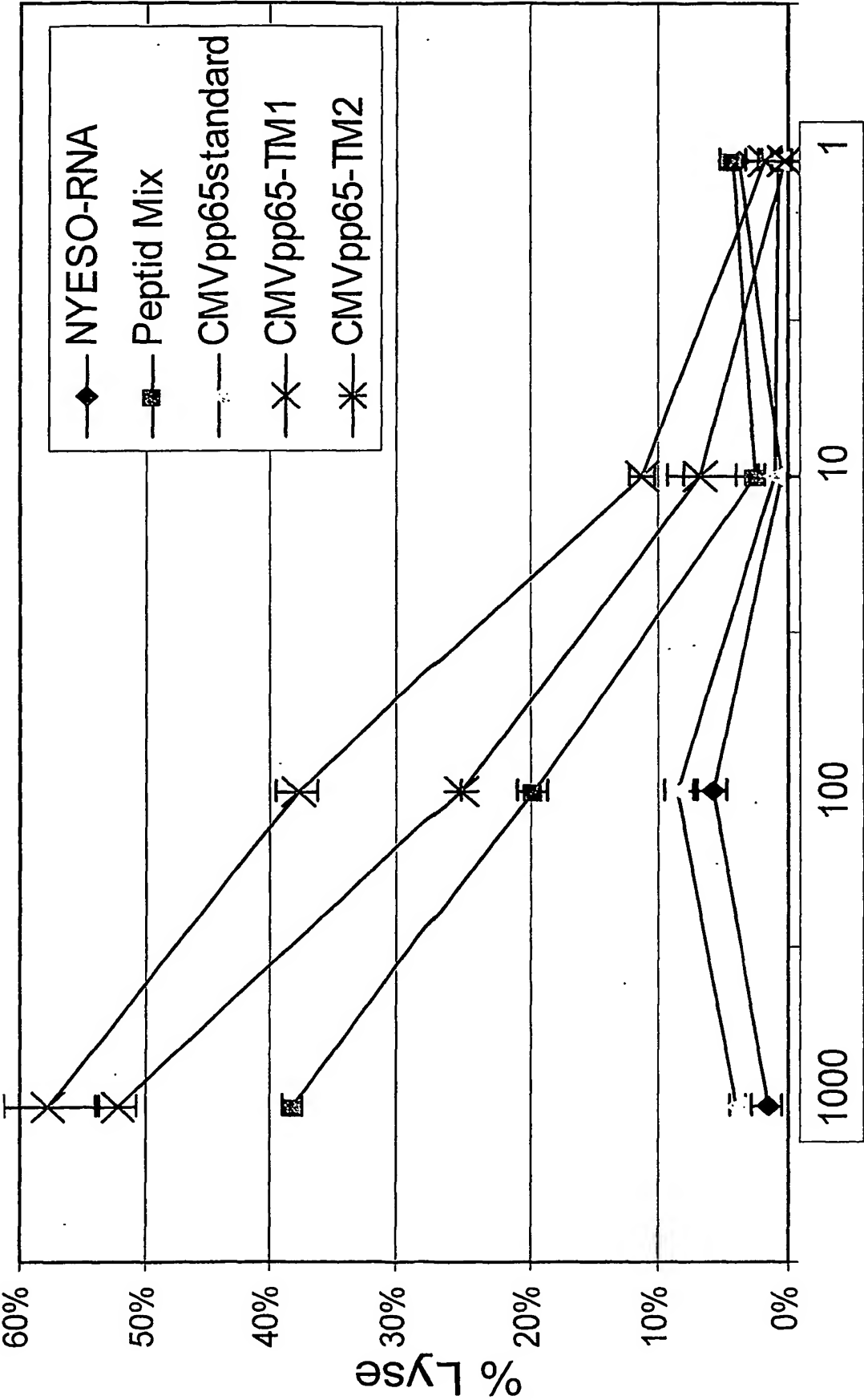


Abb. 6

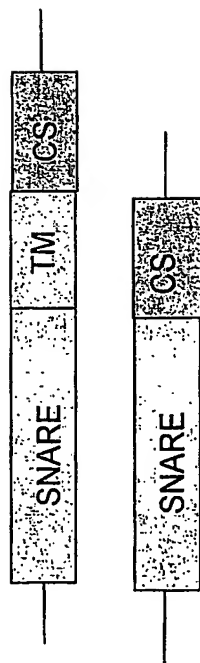


Peptidkonz.: nM

E:T= 30: 1

Abb. 7

Kassetten mit Klonierungsstellen (CS) zur Expression von erfindungsgemäßen SNARE-Fusionsproteinen



Kassetten mit einklonierten Antigenen zur Expression von erfindungsgemäßen SNARE-Fusionsproteinen

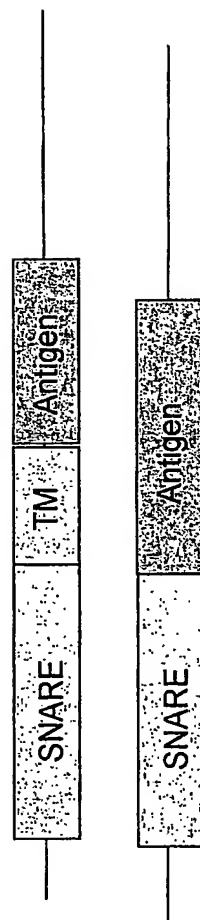


Abb. 8

SEQ ID NO		
1	Signalpeptid (SecSignal)	ATGGGGTCACGGGCCCCGACCCCTCATCTGCTGCTCTCGGGAGCCCTGGCCCTGACCG AGACCTGGGCGCGCTCC
2	Signalpeptid SecSignal	MRVTAPRTLILLSGALALTETWAGS
3	HLA-Klasse I- TM-CM	ATCGTGGGCATTTGTTGGCTGGCTGTCTCAGAGTTGTGGTCATCGGAGCTGTGGTCGCTACTGTGATGTGTAGGAGGAAGAG CTCAGGTGGAAAAGGAGGAGGAGCTACTCTCAGGCTGGTCCAGCGACAGTCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACAGCTTGA
4	HLA-Klasse I- TM-CM	IVGIVAGLAVLAVVIGAVVATVMCRKSSGGKGSYSQAASSDSAQGSDVSLTA
5	HLA-Klasse II-TM-CM	CAGAGCAAGATGCTGAGTGGAGTCGGGGCTTTGTGCTGGGCTGCTCTTCTTGGGGCGGGCTGTTCATCTACTTTCAGGAATCA GAAAGGACACTCTGGACTTCAGCCAAAGAGGATTCTCTGAGCTGA
6	HLA-Klasse II-TM-CM	QSKMLSGVGGFVLGLLLFLGAGLFTYFRNQKHSGLQPRGF LS
7		CTGCAGTCCGACTCTAGAGGATCC
8		LQVDSRGS
9	pp65-Antigen	atggagtcgcggtgcgcgtgtgtccgaaatgataccgtactgggtccatttoggggcacgtgtgaaagccgtgttttagtcg cgcgatacgccggtgctgcgcacgagacgcgactcctgcagacgggtatccacgtacggtgagccagccctcgctgatcttgg tatcgagtagacacgcccgaactgcagcccatgccaccgggagcaaatcagctcaggtgcagcacactactttacggggcagcgag gtggagaacgtgtcggtcaactgcacacccccacgggcccgaagcatctgccacagccagagcccatgtgatctatgttacgc gctgccgtcaagatgctgaacatccccagcatcaactgcacactacccgtcggcgccgagcgcaaacacccgacacccgtgccg tagctgacgtgtgattcacgcgtcgggcaagcagatgtggcagcgctcagcgtctcgggactcggcactggcactggcgtcagcag aaccagtggaaagagcccgacgtctactacacgtcagctcgtgttcccaagggacgtggcactggcactggcactggcactggc gcagagctggttgcctcatggagaacacgcgcgcaacaaagatgcaggtgtaggtgaccagtagcgaaggtgtacctggaggt ccttctggagagacgtgccctcggcaagctctttatcacgtcacgtgggtctgcagtggaagagacactgacgatgacccgc aaccgcgaaccttcatgcgccccacgagcgcaacggctttacggtgtgtgtcccaaaatataataatcaaacccgggcaagat ctcgacatcatgctggatgtggcttttacctcacacagcattttgggtgtgtgtcccaagagcatcccggtgagcgtatct caggtaacctgttgatgaacgggacagatcttctcgtgaggtacaagccatacggagacacgtggaaactgcgtcagtagatccc gtggctgcgtctctcttttttcgatatcgcactgtgctgcagcgcgggctcagtagcagagcaacccacttaccagccagta tcgcatccaggggcaagcttgtagtaaccgacacacactgggacgggacgagaggtgcccggccagggcagcagcgtctggacca gcggtacggactccgacgaagaaactcgttaaccacgagcgcaagacgccccgcgtcaccggcgggcgcccatggcgggcgctcc acttcgcgggcccgaacgcgaatcagcatcctcggcgacggcgtgcacgtcgggcggttatgacacgcggccgcttaaggccga

10	pp65-Antigen	<p>gtccaccgtcgcccggaagagacacgacgaggattccgacaaacgaaatccacaaatccggccgtgttcacctggccgcccctggc agccggcatctctggcccgcaacctggtgcccattggtggtacggttcagggtcagaatctgaagtaaccaggaaattcttctgggac gccaacgacatctaccgcatcttcgccaattggaaggcgtatggcagccgctgcgcaacccaaacgctgcgcaccggaaga cgcttgcccgggccatgcctcgctcgacgccccaaaaagcacagaggt</p> <p>MESRRRCPEMISVLGPISGHVLKAVFSRGDTPVLPHETRLQLQGIHVRVSQPSLILVSQ YTPDSTPCHRGDNQLQVQHTYFTGSEVENVSNNHNPTRICSIPSEPMISYIYALPLKM LNIP SINVHHYP SAAERKRLHLPVADAVIHASGKQMWQARLTVSGLAWTRQONQWKEPDV YYTSAFVFTKDVLRHVCAHELVCSEMENTRATKMQVIGDQYVKVYLESFCEDEVPSGKL FMHVTLGSDVEEDLTWTRNPQPFMRPHERNGFTVLPKNMIIKPGKISHIMLDVAFTSHE HFGLLCPKSI PGLSISGNLLMNGQIIFLEVQAI RETVELRQYDPVAALFFFDIDLLLRG PQYSEHPTFTSQYRIQGLKLEYRHTWDRHDEGAAGDDDDVWTSGSDSEELVTTERKTPRV TGGAMAGASTSAGRRKKSASSATAC TSGVMTRGR LKAESTVAPEEDTDESDNEIHNP VFTWPPWQAGILARNLPMVATVQGNLKYQEFFWDANDIYRIFAELEGVWQPAAPKRR RHRQDALPGPCIASTPKKHRG</p>
11	SecSignal- pp65-Antigen- HLA-Klasse I- TM-CM	<p>atgccccgtcacggcgccccgaacctcatctgctctcgggagccctggccctgacgagacctgggcccgtccctgcaggt cgactctagaggtacacatggagtcgcgggtgcgctgttcocgaaatgatacctactggttccatttcggggcacgtgc tgaaagccgtgttagtcgcggcgatacgcgggtgctgcgcacgagacgcgactoctgcagacgggtatccacgtacgctgagc cagccctcgctgatcttggtatcgagtaacgcgcgactgcagccatgccacgcgggacaaatcagctgcaggtgcagcacac gtactttacgggacgaggtggaaacgtgctggtcaacgtgcacaaacccacgggcccgaagcatctgccccagcaggagccca tgtcgatctatgtacgcgctgcgctcaagatgctgaacatccccagcatcaacgtgcacactaccctgcggcgccgagcgc aaacaccgacacctgcccgtagctgacgctgattcacgctcgggcaagcagatgtggcaggcgcgtctcacggtctcgggact ggcctggacgctcagcagaacctggaaagagcccagctctactacgctcagcgttctgttcccccaaggacgtggcac tgccgacgctggtgtgcgcgcacgagctggttctccatggagaaacacgcgcgcaacaaagatgcaggtgacagttac gtcaagggtgtacctggaactcttgaggaagctgcccctcggaagctctttatgcagctcacgctgggctctgacgtggaaga ggaacctgacgatgacccgcaacccgcaaccttcactgcgccccacgagcgcaacggctttacggtgtgtgtcccaaaataga taatcaaacgggcaagatctgcacatcatgctggtggtgcttttaacctcacagagcaattttgggctgctgtgtcccaagagc atccccggcctgagcatctcaggtaacctgttgatgaacgggcagcagatcttctcctggaggtacaagccatcacgcgagaccgtgga actggtcagtaacgacccgtggctgctctttttcgatatcgactgctgctgcagcgcgggcctcagtaacagcgagcacc ccaccttcaccagccagatcgcatccagggaagcttgatccgacacacactgggacggcagcagaggggtgccgcccagggc gacgacagctctggaccagcggtatcggaactcgacgaagaactcgttaaccaccgagcgcaagacgccccgctcacccggcgccg cgccatggcgggcctccacttcggcgggcgcaaacgcaaatcagcatcctcgcgacgggtgcacgtcgggcgttatgacac gcggcgcccttaaggcgagtcacccgtgcgcgcgaagaggaacacgaggtatccgacacgaaatccacaaatccggccgtg ttcacctggccgcccgtgagggccggcatcctggccccgaacctggtgccatggtggctacggttcagggtcagaatctgaagta ccaggaaattcttctggagcccaacgacatctaccgcatcttcgccgaattggaaggcgtatggcagccgctgcgcaccccaaac gtcgccgccacccgcaagagcccttgcccgggccatgcacgcctcgagcccccaaaaagcacagaggtggatccatcgtgggcatt gttgcctggcctggtctcctagcagttgtggtcagcgtggtgctgactgtgtgtaggaggaagagtcaggtggaaa aggaggagctactctcagctgcgtccagcgacagtgcccagggtctgctgctctcagcttga</p>

12	SecSignal- pp65-Antigen- HLA-Klasse I- TM-CM	<p>MRVTAPRTLILLSGALALTETWAGSLQVDSRGSTMESRRRCPEMISVLGPISGHVLKA VFSRGDTPVLPHETRLLOQTGIHVRVSQPSLILVSQYTPDSTPCHRGDNQLQVQHTYFTGS EVENSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPLKMLNIPSNVHHYPSAAERKHRHLPVA DAVIHASKQMWQARLTVSGLAWTRQONQWKEPDVYTSAFVFTKDVLRHVVCACHELV CSMENTRATKMQVIGDQYVKVYLESFCEDEVPSGKLFMHVTLGSDVEEDLTMTRNPQPFMR PHERNGFTVLCPKNMIKPKGKISHIMLDVAFTSHEFGLLCPKSIPLGISGNLLMNGQQ IFLEVAIRETVELRQYDFVAALFFEDIDLLQRPQYSEHPTFTSQRYIQGKLEYRHTW DRHDEGAQGGDDVWTSGSDSDEELVTERKTPTVTGGAMAGASTSAGRKRKSASSATA CTSGVMTGRGLKAESTVAPEEDTDESDNEIHNPVFTWPPWQAGILARNLVPWVATVQG QNLKYQEFFWDANDIYRIFAELGVWQPAQPKRRRRHRQDALPGPCIASTPKHRGGSIIV GIVAGLAVLAVVIGAVVATVMCRKSSGGKGSYSQAASSDSAQGSDVSLTA</p>
13	SecSignal- pp65-Antigen- HLA-Klasse II-TM-CM	<p>atgagggtcacggcgcccggaacctcatcctgctgctcgaggagccctggccctgaccgagacctgggcgggctccctgcagggtcga ctctagagatccaccatggagtcggcggtcgccgtgtcccgaaatgatatcgctactgggtccatttcgggggcacgtgctgaaag ccgtgttagtcggcgcatagcccggtgctgcgcacgagacgcgactcctgcagacgggtatccacgtacgcgtgagccagccctcg ctgactctgggtatcgcatgacacggcgactcgacgcccacgcgacacatcagctgaggtgcagcacacgtactttacggg cagcaggtggagaaacgtgtcggtcaacgtgcaacacccacggcggaagcatctgccacgagccagagagccatgtcgatctatgtg acgcgtgcgctcaagatgctgaacatccccagcatcaacgtgcaccactaccctcgggcgccgagcgcaaacaccgacacacccgccc gtagctgacgtgtgattcacgctcggaagcagatgtgcagcgcgctcaccgtctcgactggactggcgtggcgtgacgctcagcagaa ccagtggaaagagcccgacgtctactacacgtcagcgttcgtgttcccaaggacgtggcactggcgacgtgggtgctgcgcgcacg agctggttgcctccatggagaaacacgcgcgcaacaaagatgaggtgataagtgacagtagctcaaggtgtactggagtcctctgc gaggacgtgccctccgcaagctcttatgcagctcagctggctctgacgtggagagagacctgacgtgacccgcaacccgcaacc cttcacgtgcgccacagcgcaacgctttacgggtgtgtgtcccaaaaatagataataacacggcgcaagatctcgacatcatgc tggatgtggctttacctcacacgagcatgttgggtgtgtgtcccaagacatccggcgctgagcatctcaggtaacctgttgatg aacggcgacagcatcttctggaggtacaagccatacgcgagacgctggaactcgctgacgtacgatcccggtggctgcgctctctttt cgatatcgacttgctgcagcgcgcgctcagtagacgagacacccaccttcacagccagtagatcgcatccagggcgaagcttgagt accgacacacccctgggaccggcgacgacgaggggtgccgcgcaaggcgacgacgactctggaccagcggtcggaactccgacgaagaactc gtaaccacgagcgcaagacgccccgctcacggcgcgcccatggcgggcgctccactccgcgggccgcaaacgcaaatcagc atcctcgcgacggcggtgacgtcgggcgttatgacacgcgccgccttaaggccgagtcacccgtcgccccgaagagacacccgacg aggattccgacaaacgaaatccaaatccggcggtgttcacctggcgccctggcagcgccgcatcctggccccgaacctggtgccccatg gtggtaacggttcagggtcagaatctgaagtagcaggaaattcttctggagcgcacacgacatctaccgcatcttcgccgaattggaagg cgtatggcagcccgctgcgaaccccaacgctgcgcgccacccgcaagacgcttgcggggcccatgcatcgccctgacgcccccaaaagc accgaggtggatccagagcaagatgctgagtgagtcgggggcttctgctgggcctgctcttccctgggcccgggctgttcattcatc ttcaggaatcagaaaggacactctggacttcagccaaaggattcctgagctga</p>
14	SecSignal- pp65-Antigen- HLA-Klasse II-TM-CM	<p>MRVTAPRTLILLSGALALTETWAGSLQVDSRGSTMESRRRCPEMISVLGPISGHVLKA VFSRGDTPVLPHETRLLOQTGIHVRVSQPSLILVSQYTPDSTPCHRGDNQLQVQHTYFTGS EVENSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPLKMLNIPSNVHHYPSAAERKHRHLPVA DAVIHASKQMWQARLTVSGLAWTRQONQWKEPDVYTSAFVFTKDVLRHVVCACHELV</p>

64	PRAME Variante 1	<p>CSMENTRATKMQVIGDQYVKVYLESCFEDVPSGKLFMHVTLGSDVEEDLTMTRNPQPFMR PHERNGFTVLCPKNMIKPGKISHIMLDVAFTSHEHFGLCPKSIPLGLSISGNLMMNGQQ IFLEVOAIRETVELRQYDPVAALFFFDIDLLQRGPOYSEHPTFTSQYRIQKGLEYRHTW DRHDEGAQGGDDVWTSGSDSDEELVTTERKTPRVTTGGAMAGASTSAGRKRKRSASATA CTSGVTRGRILKAESTVAPEEDTDESDNEIHNPVFTWPPWQAGILARNLVPVMAVTVQG QNLKYQEFFWDANDIYRIFAELGVWQPAAPKRRRRHRQDALPGPCIASTPKKHRGGSQS KMLSGVGGFVLGLLFLGAGLEIFRNQKSHSLQPRGELS</p> <p>1 atggaacgaa ggcgtttgtg ggtttccatt cagagccgat acatcagcat gagtgtgtg 61 acaagccac ggaacttgt ggagctggca gggcagagcc tgctgaagga tgagccctg 121 gccattgcc ccttgagtt gctgcccagg gactcttcc cgccactctt catggcagcc 181 tttagcggga gacacagcca gacctgaag gcaatggtg aggcctggcc cttcacctgc 241 ctccctctgg gagtgtgat gaaggacaa catcttcacc tggagacctt caaagctgtg 301 cttgatggac ttgatgtgct ccttgcccag gaggttcgcc ccaggaggtg gaaacttcaa 361 gtgctggatt tacggaagaa ctctcatcag gacttctgga ctgtatggtc tggaaacagg 421 gccagtctgt actcatttcc agagccagaa gcagctcagc ccatacaaaa gaagcgaaaa 481 gtatgtggtt tgagcacaga ggcagagcag ccccttcattc cagttagaggt gctcgtagac 541 ctgttctcca aggaaggtgc ctgtgatgaa ttgttctcct acctcattga gaaagtgaag 601 cgaagaaaa atgtactacg cctgtgtgtt aagaagctga agatttttgc aatgcccattg 661 caggatatca agatgacct gaaaatggtg cagctggact ctattgaaga tttagaagtg 721 acttgtacct ggaagctacc caccttggcg caattttctc cttacctggg ccagatgatt 781 aatctgcgta gactctcct ctcccacatc catgcatctt cctacatttc cccggagaag 841 gaagagcagt atatgccca gttcacctct cagttcctca gtctgcagtg cctgcaggct 901 ctctatgtgg actctttatt ttctcttaga ggcgcctgg atcagttgct caggcacgtg 961 atgaacccct tggaaacccct ctcaataact aactgccgc tttaggaagg gtagtgtatg 1021 catctgtccc agagtcccag cgtcagtcag ctaagtgtcc tgagtctaag tggggtcatg 1081 ctgaccgatg taagtccca gcccctcaa gctctgttg agagagctc tgccacctc 1141 caggacctgg tctttgatga gtgtggatc acggatgatc agtctcttc cctcctgct 1201 tccctgagcc actgctcca gcttacaacc ttaagcttct acgggaattc catctccata 1261 tctgcttgc agagtctct gcagcacctc atcgggctga gcaatctgac ccacgtgctg 1321 tatctgtcc cctggagag ttatgaggac atccatggta cctccacct ggagaggtt 1381 gcctatctgc atgccaggct caggagttg ctgtgtgagt tggggcgcc cagcatggtc 1441 tggcttagtg ccaacccctg tctcactgt ggggacagaa cctctatga cccggagccc 1501 atcctgtcc cctgtttcat gctaac</p> <p>1 atggaacgaa ggcgtttgtg ggtttccatt cagagccgat acatcagcat gagtgtgtg 61 acaagccac ggaacttgt ggagctggca gggcagagcc tgctgaagga tgagccctg 121 gccattgcc ccttgagtt gctgcccagg gactcttcc cgccactctt catggcagcc 181 tttagcggga gacacagcca gacctgaag gcaatggtg aggcctggcc cttcacctgc 241 ctccctctgg gagtgtgat gaaggacaa catcttcacc tggagacctt caaagctgtg 301 cttgatggac ttgatgtgct ccttgcccag gaggttcgcc ccaggaggtg gaaacttcaa 361 gtgctggatt tacggaagaa ctctcatcag gacttctgga ctgtatggtc tggaaacagg 421 gccagtctgt actcatttcc agagccagaa gcagctcagc ccatacaaaa gaagcgaaaa 481 gtatgtggtt tgagcacaga ggcagagcag ccccttcattc cagttagaggt gctcgtagac 541 ctgttctcca aggaaggtgc ctgtgatgaa ttgttctcct acctcattga gaaagtgaag 601 cgaagaaaa atgtactacg cctgtgtgtt aagaagctga agatttttgc aatgcccattg 661 caggatatca agatgacct gaaaatggtg cagctggact ctattgaaga tttagaagtg 721 acttgtacct ggaagctacc caccttggcg caattttctc cttacctggg ccagatgatt 781 aatctgcgta gactctcct ctcccacatc catgcatctt cctacatttc cccggagaag 841 gaagagcagt atatgccca gttcacctct cagttcctca gtctgcagtg cctgcaggct 901 ctctatgtgg actctttatt ttctcttaga ggcgcctgg atcagttgct caggcacgtg 961 atgaacccct tggaaacccct ctcaataact aactgccgc tttaggaagg gtagtgtatg 1021 catctgtccc agagtcccag cgtcagtcag ctaagtgtcc tgagtctaag tggggtcatg 1081 ctgaccgatg taagtccca gcccctcaa gctctgttg agagagctc tgccacctc 1141 caggacctgg tctttgatga gtgtggatc acggatgatc agtctcttc cctcctgct 1201 tccctgagcc actgctcca gcttacaacc ttaagcttct acgggaattc catctccata 1261 tctgcttgc agagtctct gcagcacctc atcgggctga gcaatctgac ccacgtgctg 1321 tatctgtcc cctggagag ttatgaggac atccatggta cctccacct ggagaggtt 1381 gcctatctgc atgccaggct caggagttg ctgtgtgagt tggggcgcc cagcatggtc 1441 tggcttagtg ccaacccctg tctcactgt ggggacagaa cctctatga cccggagccc 1501 atcctgtcc cctgtttcat gctaac</p>
65	WT1 Variante C	<p>1 atgggctccg acgtgcggga cctgaacgcg ctgctgccg ccgtccctc cctgggtggc 61 ggcggcggt gtgcccgtcc tgtgagcgcg gcggcgaggt gggcgccgt gctggacttt 121 gcgcccccg gcgcttcggc ttacgggtcg ttggcgccg ccgcgcgcc accggctccg 181 ccgccacccc cgccgcgcc gcctcactcc ttcatcaaac aggagccgag ctggggcgcc 241 gcggagccgc acgaggagca gtgcctgagc gcctcactg tccactttc cggccagttc 301 actggcacag ccggagcctg tcgtacagg ccttcggtc ctctccgc cagccaggcg</p>

<p>361 tcctccggcc aggcaggat gtttctaac gcgccttaac tgccagctg cctcgagagc 421 cagcccgcta ttgcgaatca gggttacagc acggtcacct tgcagggagc gccagctac 481 ggtcacagc cctcgaccca tgcggcgagc tcccccaac actcattcaa gcatgaggat 541 cccatgggccc agcagggtc gctgggtgag cagcagctact cggcgccgccc cccggtctat 601 ggtgcccaca ccccaccga cagctgcacc ggcagccagg ctttgtctgct gaggacgccc 661 tacagcagtg acaatttata ccaaatgaca tcccagcttg aatgcatgac ctggaatcag 721 atgaacttag gagccacctt aaagggccac agcacagggt acgagagcga taaccacaca 781 acgcccaccc tctgcggagc ccaatacaga atacacagc acggtgtctt cagaggcatt 841 caggatgtgc gacgtgtgcc tggagtggcc cggactcttg tacgggtcggc atctgagacc 901 agtgagaaac gcccttcat gtgtgcttac ccaggctgca ataagagata ttttaagctg 961 tcccacttac agatgcacag caggaagcac actggtgaga aaccatacca gtgtgacttc 1021 aaggactgtg aacgaagggt ttctcgttca gaccagctca aaagacacca aaggagacat 1081 acaggtgtga aaccattcca gtgtaaaact tgtcagcgaa agttctcccg gtccgaccac 1141 ctgaagaccc acaccaggac tcatacaggt aaacaaagtg aaaagccctt cagctgtcgg 1201 tggccaagtt gtcagaaaaa gttgcccgg tcagatgaat tagtcggcca tcacaacatg 1261 catcagagaa acatgaccaa actccagctg ggcgtt</p>	<p>66</p> <p>p53</p> <p>1 atggaggagc cgcagtcaga tcctagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacatttca 61 gacctatgga aactacttcc tgaatacaac gtctgtccc ccttgccgtc ccaagcaatg 121 gatgatttga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggt tcaactgaaga cccaggtcca 181 gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct ccccgctggg cccctgcacc agcagctcct 241 acaccggcgg cccctgcacc agccccctcc tggccccctgt catctctgt cccttcccag 301 aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcattctgg gacagccaaag 361 tctgtgactt gcacgtactc cctgccccctc aacaagatgt ttgccaact ggccaagacc 421 tgccctgtgc agctgtgggt tgattccaca ccccccccg gcaccgcgt ccgcgccatg 481 gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgtgccc ccaccatgag 541 cgctgctcag atagcgatgg tctggccccct cctcagcatc ttatccgagt ggaaggaaat 601 ttgcgtgtgg agtatttggg tgacagaaac acttttcgac atagtgtggt ggtgccctat 661 gaccgctg aggttggctc tgactgtacc accatccact acaactacat gtgtaacagt 721 tcctgcattg gcggcatgaa ccggaggccc atcctacca tcatacact ggaagactcc 781 agtggtaatc tactgggacg gaacagcttt gaggtgctg tttgtgctg tcctgggaga 841 gaccggcgca cagaggaaaga gaatctccg aagaaagggg agcctcacc cagctgccc 901 ccaggagagca ctaagcgagc actgcccac aacaccagct cctctcccca gccaaagaag 961 aaaccactgg atggagaata ttaccacctt cagatccgtg ggcgtgagcg cttcgagatg 1021 ttccgagagc tgaatgagc cttggaactc aaggatgcc aggtgggaa ggagccaggg 1081 gggagcaggg ctcactccag ccacctgaag tccaaaaagg gtcagtctac ctcccgccat 1141 aaaaaactca tgttcaagac agaaggcct gactcagac</p>
--	---

Abb. 10:

SEQ ID NO	Typ	Name	Sequenz
43	SNARE	Cis-golgi SNARE p28	MAAGTSSYWE DLRKQARQLE NELDLKLVSF SKLCTSYSHS STRDGRDRY SSDTTPLLNG SSQDRMFETM AIEIEQLLAR LTGVNDKMAE YTNAGVPSL NAALMHTLQR HRDILQDYTH EFHKTKANFM AIRERENLMG SVRKDIESYK SSGVNNRRT EFLKEHDHL RNSDRLEIET ISIAMATKEN MTSQRGMLKS IHKSMNTLAN RFAVNSLIQ RINLRKRRDS LIILGGVIGIC TILLIYAFH
44	SNARE	VTI1b	MGASLTSPGT QEKLRDFDE KQOEANKMLT QMEEEELHYAP VSEHNPMMSK LQDYQKDLAQ FHLEARTMPG DRGDMKYGT AVENEHNMRL OSQRAMLIQG TKSILGRATQE TDQIGSEISE EIGNORDQ
45	SNARE	Membrin	MDPLFQOQTHK QVHEIQSCMG RLETADKQSV HIVENEIQAS IDQIFSRLEL LEILSSKEPP NKRQNAARLV DQLYDVQHL QTALRNFQHR RHAREQQERQ REELLSRTFT TNDSDTTIPM DESLOFNSSL QKVHNGMDDL ILDGHNILDG LRTQRLTLKG TQKKILDIAN MLGLSNTVMR LIEKRAFQDK YFMIGGMLLT CVMFLVVQY LT
46	SNARE	Pallidin	MSVPGPSSPD GALTRPPYCL EAGEPTPGLS DTSPDEGLIE DLTIEDKAVE QLAEGLLSHY LPDLQRSKQA LQELTQNVV LLDLTLEQEIS KFECHSMMLD INALFAEAKH YHAKLVNIRK EMIMLHEKTS KIKKRALKIQ QKRQKEELER EQQREKEFER EKQLTARPAK RM
47	SNARE	Syntaxin-5	MSCRDRTQEE ISACKSLOTR QNGIQTNKPA LRVRQRSEF TLMAKRIGKD LSNTFAKLEK LTIILAKRKS L FDDKAVEIEE LTYIIKQDIN SLNKQIAQLQ DFVRAKGSQS GRHLQTHSNT IVVSLQSKLA SMSNDFKSVL EVRTENLKQQ RSRREQFSRA PVSALPLAPN HLGGAVALG AESHASKDVA IDMMSRSTQ QLQLIDEQDS YIQSRADTMQ NIESTIVELG SIFQQLAHNV KEQEETIQRI DENVLGAQLD VEAHSEILK YFQSVTSNRW LMVKIFLILI VFFIIFVVFL A
48	SNARE	Syntaxin-6	MSMEDPFFV KGEVQKAVNT AQCLFQRWTE LLQDPSTATR EEIDWTTNEL RNNLRSIEWD LEDLDETISI VEANPRKFNL DATELSIRKA FITSTRQVVR DMKDOMSTSS VQALAEKNR QALLGDSGSQ NWSTGTTDKY GRDLRELQRA NSHFIEEQQA QQQLIVEQQD EQLELVSGSI GVLKNMSQRI GGELEEQAVM LEDFSHELES TQSRLDNVMK KLAQVSHMTS DRRQWCAIAI LFAVLLVVLI LFLVL
49	SNARE	Syntaxin-7	MSYTPGVGGD PAQLAQRISS NIQKITQCSV EIQTINQLG TPQDSPELRQ QLQKQOQYTN QLAKETDKYI KEFGSLPTTP SEQRQRKIQK DRLVAEFTTS ITNFQKVQRQ AAEREKEFVA RVRASSRVSG SPEDSSKER NLVSWESQTQ PQVQVQDEEI TEDDLRLIHE RESSIRQLEA DIMDINEIFK DLGMMIHEQG DVIDSIEANV ENAEVHVQQA NQQLSRAADY QRKSRKTLCI IILILVIGVA IISLIWGLN H

50	SNARE	Syntaxin-8	MAPDPWFSTY DSTCQIAQEI AEKIQQRNQY ERKGEKAPKL TVTIRALLQN LKEKIALKLD LLLRVSTHQ ITQLEGDRRQ NILDDLVTRE RLLASFKE GAEPDLIRSS LMSEAKRGA PNPWFEEPE ETRGLGFDEI RQQQKIIQE QDAGLDALSS IISRQKQMGQ EIGNELDEQN EIIDDLANLV ENTDEKLNE TRRVNMVDRK SASCGMIMVI LLLLVAIVV AVWFTN
51	SNARE	Syntaxin-10	MSLEDPFVV RGEVQKAVNT ARGLYQRWCE LQESAAVGR EELDWTNNEL RNGLRSIEWD LEDLEETIGI VEANPGKFAA QKSPSDDLDA SAVSATSYRI EEQATQQLI MDEQDQLEM VSGSIQVLKH MSGRVGEELD EQGIMLDAFA QEMDHTQSRM DGVLRKLAKV SHMTSDRRQW CAIAVLGVVL LVLILFSL
52	SNARE	SYNTAXIN-10a	MSLEDPFVV RGEVQKAVNT ARGLYQRWCE LQESAAVGR EELDWTNNEL RNGLRSIEWD LEDLEETIGI VEANPGKFKL PAGDLQERKV FVERMREAVQ EMKDHMVSPT AVAFLENNR EILAGKPAQ KSPSDDLDA AVSATSYRI EEQATQQLIM DEQDQQLEMV SGSIQVLKHM SGRVGEELDE QGIMLDAFAQ EMDHTQSRM DGVLRKLAKVS HMTSDRRQWC AIAVLGVLL LVLILFSL
53	SNARE	Syntaxin-11	MKDRLAELLD LSKQYDQFP DGDDEFDSPH EDIVFETDHI LESLYRDIRD IQDENQLLVA DVKRLGKQNA RELTSMRRLS SIKRDTNSIA KAFRARGEVI HCKLRAMKEL SEAAEAQHGP HSAVARISRA QYNALTITFQ RAMHDYNQAE MKQRDNCKIR IQRQLEIMGK EVSGDQIEDM FEQGWKDVFS ENLLADVKGK GPPTTRSRAA TANCCAWRAA IRDVHELEFLQ MAVLVEKQAD TLNVIELNVQ KTVDYTGQAK AQVRKAVQYE EKNPCRTLCC FCCPCLK
54	SNARE	Syntaxin-12	MSYGPLDMYR NPGSPGPQLR DFSSIIQCS GNIQIRISQAT AQIKNIMSQ L GTKQDSSKLQ ENLQQLQHST NQAKETNEL IKELGSLPLP LSTSEQRQOR IQKERIMNDF SAALNNFQAV QRRVSEKEKE SIARARAGSR ISAEERQREE QLVSFDSHEE WNQMOSQEDE VAITEQDLEL IKERETAIRQ LEADILDVNQ IFKDLAMMIH DQGDLDISIE ANVESSEVHV ERATEQLQRA AYYQKKSRKK MCILVLVLSV IILILGLIIV LVYKTK
55		Syntaxin-17	MSEDEEKVKL RRLEPAIQKF IKIVIPTNLE RLRKHQINIE KYQRCRIWDK LHEEHINAGR TVQQLRSNIR EIEKLCCLKVR KDDLVLKRM IDPVKEESA ATAEFLQLHL ESVEELKKQF NDEETLLQPP LTRSMTVGGA FHTTEAEASS QSLTQIYALP EIPQDQNAAE SRETLEADLI ELSOLVTDFS LLVNSQQEKI DSIADHVNSA AVNVEEGTKN LGKAAKYKLA ALPVAGALIG GMVGGPIGLL ACFKVAGIAA ALGGGVLGFT GGKLIQRKKQ KMMEKLTSSC PDLPSQTDKK CS
56	SNARE	VAMP-2	MSATAATAPP AAPAGEGGPP APPNLTNSR RLQQTQAQVD EVVDIMRVNV DKVLERDQKL SELDDRADAL QAGASQFETS AAKLRKYWV KNLKMMIILG VICAIILIII IVYFSS
57	SNARE	VAMP-3	MSTGPTAATG SNRLQQTQN QVDEVVDIMR VNVDKVLERD QKLSELDRA DALQAGASQF ETSAAKLRK YWKNCKMWA IGITVLVIFI IILIVWVSS

58	SNARE	VAMP-4	MPPKFKRHLN DDDVTGSVKS EERNLLEDDS DEEEDEFFLRG PSGPRFGPRN DKIKHVQNVQV DEVIDVMPEN ITKVIERGER LDELQDKSES LSDNATAFSN RSKQLRRQMW WRGCKIKAIM ALVAAIILLV IILIVMKYR T
59	SNARE	VAMP-7	MAILFAVVAR GTTILAKHAW CGGNFLEVTE QILAKIPSEN NKLTYSHGNY LFHYICQDRI VYLCITDDDF ERSRAFNFLN EIKKRFQTTY GSRAQTALPY AMNSEFSSVL AAQLKHHSN KGLDKVMEQ AQVDELKGIN VRNIDLVAQR GERLELLIDK TENLVDSSVT FKTTSRNLAR AMCMKNLKT IILIVSIVE IYIIVSPLCG GFTWPSCVKK
60	SNARE	VAMP8	MEEASEGGN DRVRNLQSEV EGVKNIMTQN VERILARGEN LEHLRNKTED LEATSEHEFT TSQKVARKFW WKNVKMIVLI CVIVFIILF IVLEATGAFS
61	SNARE	VT11-a-beta	MSDDFEGYEQ DPAVLTAET SKIARVPRLP PDEKKQMVAN VEKQLEEAKE LLEQMDLEVR EIPPOSRGMY SNRMRSYKQE MGKLETDFKR SRIAYSDEVN NELLGDDGNS SENQRAHLLD NTERLERSR RLEAGYQIAV ETEQIGQEML ENLSHDREKI QRARERLRET DANLGKSSRI LTGMLRRGCS VKKQCNLSLA PKA
62	SNARE	XP350893	MRDRLPDLTA CRKNDDGDTV VVVEKDHMD DFFHQVEEIR NSIDKITQYV EEVKNHSII LSAPNPEGKI KEELEDLNKE IKKTANKIRA KLKAIEQSFQ QDESGNRTSV DLRIRRTQHS VLSRKFEVEAM AEYNEAQTLE RERSKGRIQR QLEITGRITTT DDELEEMLES GKPSIFTSDI ISDSQITRQA INEIESRHKD IMKLETSIRE LHEMFMDMAM FVETQGEMIN NIERNVMNAT DYVEHAKKET KKAIKYQSKA RRVSLASKN
63	SNARE	LIP5	QMAALAPLPP LPAQFKSIQH HLRTAQEHDK RDPVVAYYCR LYAMQTMKI DSKTPECRKF LSKLMDQLEA LKKQLGDNEA ITQEIIVGCAX LENYALKMFL YADNEDRAGR FHKNMKSEY TASLLIDVIT VFGEITDENV KHRKYARWKA TYIHNCLKEW GDSSSRPCWE LKKIMILKKM KMLEQPLCPL SQLSHHHLQL MTQQHAIRQL YWNTDSSGCT RSS

BEST AVAILABLE COPY

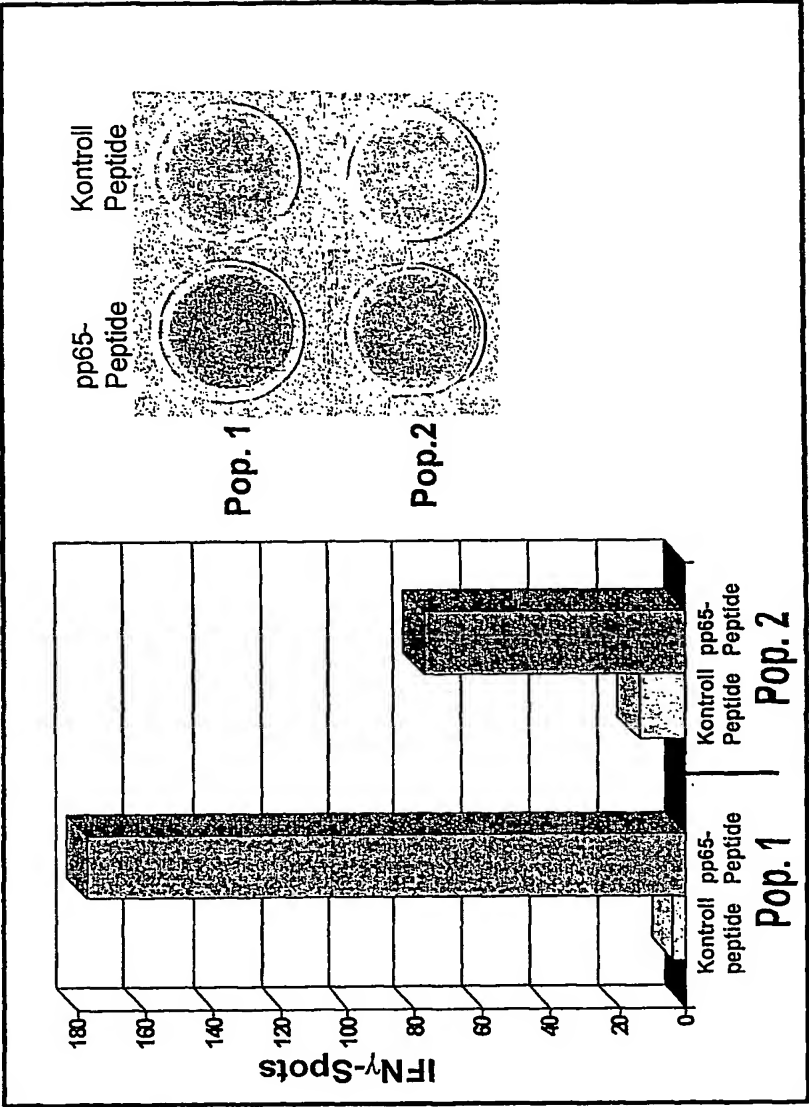


Abb. 11

410-1PCTST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Johannes Gutenberg-Universität Mainz, vertreten durch den Präsidenten

<120> Rekombinante Impfstoffe und deren Verwendung

<130> 410-1PCT

<150> DE 103 47 710.1

<151> 2003-10-14

<160> 66

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 78

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgcgggtca cggcgcccg aaccctcatc ctgctgctct cgggagccct ggccctgacc 60

gagacctggg ccggctcc 78

<210> 2

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Val Thr Ala Pro Arg Thr Leu Ile Leu Leu Leu Ser Gly Ala
1 5 10 15

Leu Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser
20 25

<210> 3

<211> 168

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atcgtgggca ttgttgctgg cctggctgtc ctagcagttg tggatcatcgg agctgtggtc 60

gctactgtga tgtgtaggag gaagagctca ggtggaaaag gagggagcta ctctcaggct 120

gcgtccagcg acagtgccca gggctctgat gtgtctctca cagcttga 168

<210> 4

<211> 55

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu Ala Val Leu Ala Val Val Val Ile
1 5 10 15

Gly Ala Val Val Ala Thr Val Met Cys Arg Arg Lys Ser Ser Gly Gly
20 25 30

410-1PCTST25.txt

Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly
 35 40 45

Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala
 50 55

<210> 5
 <211> 129
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 cagagcaaga tgctgagtgg agtcggggggc tttgtgctgg gcctgctctt ccttggggcc 60
 gggctgttca tctacttcag gaatcagaaa ggacactctg gacttcagcc aagaggattc 120
 ctgagctga 129

<210> 6
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Gln Ser Lys Met Leu Ser Gly Val Gly Gly Phe Val Leu Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Phe Leu Gly Ala Gly Leu Phe Ile Tyr Phe Arg Asn Gln Lys Gly His
 20 25 30

Ser Gly Leu Gln Pro Arg Gly Phe Leu Ser
 35 40

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<400> 7
 ctgcaggtcg actctagagg atcc 24

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

<400> 8
 Leu Gln Val Asp Ser Arg Gly Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 1683
 <212> DNA
 <213> Cytomegalovirus

<400> 9
 atggagtcgc gcggtcgccg ttgtcccgaa atgatatccg tactgggtcc catttcgggg 60

410-1PCTST25.txt

```

cacgtgctga aagccgtgtt tagtcgcggc gatacgccgg tgctgccgca cgagacgcga 120
ctcctgcaga cgggtatcca cgtacgcgtg agccagccct cgctgatctt ggtatcgag 180
tacacgcccc actcgacgcc atgccaccgc ggcgacaatc agctgcaggt gcagcacacg 240
tacttttacgg gcagcgaggt ggagaacgtg tcggtcaacg tgcacaaccc cacggggccga 300
agcatctgcc ccagccagga gccatgtcg atctatgtgt acgcgctgcc gctcaagatg 360
ctgaacatcc ccagcatcaa cgtgcaccac taccgctcgg cggccgagcg caaacaccga 420
cacctgcccc tagctgacgc tgtgattcac gcgtcgggca agcagatgtg gcaggcgctg 480
ctcacggtct cgggactggc ctggacgcgt cagcagaacc agtggaaga gcccgacgtc 540
tactacacgt cagcgttcgt gtttccacc aaggacgtgg cactgcggca cgtggtgtgc 600
gcgacagagc tggtttgctc catggagaac acgcgcgcaa ccaagatgca ggtgataggt 660
gaccagtacg tcaaggtgta cctggagtcc ttctgcgagg acgtgccctc cggcaagctc 720
tttatgcacg tcacgtggg ctctgacgtg gaagaggacc tgacgatgac ccgcaacccg 780
caacccttca tgcgccccca cgagcgcaac ggctttacgg tgttgtgtcc caaaaatatg 840
ataatcaaac cgggcaagat ctgcacatc atgctggatg tggcttttac ctcacacgag 900
cattttgggc tgctgtgtcc caagagcatc ccgggcctga gcatctcagg taacctgttg 960
atgaacgggc agcagatctt cctggaggta caagccatac gcgagaccgt ggaactgcgt 1020
cagtacgatc ccgtggctgc gctcttctt ttcgatatcg acttgctgct gcagcgcggg 1080
cctcagtaca gcgagacccc caccttcacc agccagtatc gcatccaggg caagcttgag 1140
taccgacaca cctgggaccg gcacgacgag ggtgccgccc agggcgacga cgacgtctgg 1200
accagcggat cggactccga cgaagaactc gtaaccaccg agcgcaagac gccccgcgtc 1260
accggcggcg gcgccatggc gggcgctcc acttccgcgg gccgcaaacg caaatcagca 1320
tcctcggcga cggcgtgcac gtcgggcgtt atgacacgcg gccgccttaa ggccgagtc 1380
accgtcgcgc ccgaagagga caccgacgag gattccgaca acgaaatcca caatccggcc 1440
gtgttcacct ggccgccctg gcaggccggc atcctggccc gcaacctggg gcccatggtg 1500
gctacggttc agggtcagaa tctgaagtac caggaattct tctgggacgc caacgacatc 1560
taccgcatct tcgccgaatt ggaaggcgta tggcagcccg ctgcgcaacc caaacgtcgc 1620
cgccaccggc aagacgcctt gcccgggcca tgcacgcct cgacgcccga aaagcaccga 1680
ggt 1683

```

```

<210> 10
<211> 561
<212> PRT
<213> Cytomegalovirus
<400> 10

```

```

Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser Val Leu Gly
1          5          10          15

```

410-1PCTST25.txt

Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg Gly Asp Thr
 20 25 30
 Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly Ile His Val
 35 40 45
 Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr Thr Pro Asp
 50 55 60
 Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val Gln His Thr
 65 70 75 80
 Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn Val His Asn
 85 90 95
 Pro Thr Gly Arg Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr
 100 105 110
 Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val
 115 120 125
 His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His Leu Pro Val
 130 135 140
 Ala Asp Ala Val Ile His Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp Gln Ala Arg
 145 150 155 160
 Leu Thr Val Ser Gly Leu Ala Trp Thr Arg Gln Gln Asn Gln Trp Lys
 165 170 175
 Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp
 180 185 190
 Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val Cys Ser Met
 195 200 205
 Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val
 210 215 220
 Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu
 225 230 235 240
 Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp Leu Thr Met
 245 250 255
 Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe
 260 265 270
 Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser
 275 280 285

410-1PCTST25.txt

His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu
 290 295 300
 Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu
 305 310 315 320
 Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile Arg Glu Thr
 325 330 335
 Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp
 340 345 350
 Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr
 355 360 365
 Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr
 370 375 380
 Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp
 385 390 395 400
 Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys
 405 410 415
 Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser
 420 425 430
 Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ser
 435 440 445
 Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro
 450 455 460
 Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His Asn Pro Ala
 465 470 475 480
 Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu
 485 490 495
 Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Glu
 500 505 510
 Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu
 515 520 525
 Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg His Arg Gln
 530 535 540
 Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys Lys His Arg
 545 550 555 560

410-1PCTST25.txt

Gly

<210> 11
 <211> 1962
 <212> DNA
 <213> künstliche Sequenz

<400> 11
 atgcgggtca cggcgccccg aaccctcatc ctgctgctct cgggagccct ggccctgacc 60
 gagacctggg ccggctccct gcaggctgac tctagaggat ccaccatgga gtcgcgcggt 120
 cgccgttgtc ccgaaatgat atccgtactg ggtcccatth cggggcacgt gctgaaagcc 180
 gtgttttagtc gcggcgatac gccggtgctg ccgcacgaga cgcgactcct gcagacgggt 240
 atccacgtac gcgtgagcca gccctcgtg atcttggtat cgcagtacac gcccgactcg 300
 acgccatgcc accgcggcga caatcagctg cagggtgcagc acacgtactt tacgggcagc 360
 gaggtggaga acgtgtcggg caacgtgcac aacccacgg gccgaagcat ctgccccagc 420
 caggagccca tgtcgatcta tgtgtacgcg ctgccgctca agatgctgaa catccccagc 480
 atcaacgtgc accactaccc gtcggcgggc gagcgcaaac accgacacct gcccgtagct 540
 gacgctgtga ttcacgcgtc gggcaagcag atgtggcagg cgcgtctcac ggtctcggga 600
 ctggcctgga cgcgtcagca gaaccagtgg aaagagcccc acgtctacta cacgtcagcg 660
 ttcgtgtttc ccaccaagga cgtggcactg cggcacgtgg tgtgcgcgca cgagctgggt 720
 tgctccatgg agaacacgcg cgcaaccaag atgcagggtga taggtgacca gtacgtcaag 780
 gtgtacctgg agtccttctg cgaggacgtg ccctccggca agctctttat gcacgtcacg 840
 ctgggctctg acgtggaaga ggacctgacg atgaccgcga acccgcaacc cttcatgcgc 900
 cccacagagc gcaacggctt tacgggtgtt tgtcccaaaa atatgataat caaacggggc 960
 aagatctcgc acatcatgct ggatgtggct tttacctcac acgagcattt tgggctgctg 1020
 tgtccaaga gcatcccggg cctgagcatc tcaggtaacc tggtgatgaa cgggcagcag 1080
 atcttcctgg aggtacaagc catacgcgag accgtggaac tgcgtcagta cgatcccgtg 1140
 gctgcgctct tctttttcga tatcgacttg ctgctgcagc gcgggcctca gtacagcgag 1200
 caccacacct tcaccagcca gtatcgcatc cagggaagc ttgagtaccg acacacctgg 1260
 gaccggcacg acgagggtgc cgcccagggc gacgacgacg tctggaccag cggatcggac 1320
 tccgacgaag aactcgtaac caccgagcgc aagacgcccc gcgtcaccgg cggcggcgcc 1380
 atggcggggc cctccacttc cgcggggccg aaacgcaaat cagcatcctc ggcgacggcg 1440
 tgcacgtcgg gcgttatgac acgcggccgc cttaaggccg agtccaccgt cgcgcccga 1500
 gaggacaccg acgaggattc cgacaacgaa atccacaatc cggccgtggt cacctggccg 1560
 ccctggcagg ccggcatcct ggcccgaac ctggtgccc a tgggtggctac ggttcagggt 1620
 cagaatctga agtaccagga attcttctgg gacgccaacg acatctaccg catcttcgcc 1680
 gaattggaag gcgtatggca gcccgctgcg caacccaaac gtcgccgcca ccggcaagac 1740

410-1PCTST25.txt

gccttgcccg ggccatgcat cgcctcgacg cccaaaaagc accgaggtgg atccatcgtg 1800
 ggcattgttg ctggcctggc tgtcctagca gttgtggtca tcggagctgt ggtcgctact 1860
 gtgatgtgta ggaggaagag ctcaggtgga aaaggagga gctactctca ggctgcgtcc 1920
 agcgacagtg cccaggggtc tgatgtgtct ctcacagctt ga 1962

<210> 12
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

<400> 12

Met Arg Val Thr Ala Pro Arg Thr Leu Ile Leu Leu Leu Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser Leu Gln Val Asp Ser Arg
 20 25 30

Gly Ser Thr Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser
 35 40 45

Val Leu Gly Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg
 50 55 60

Gly Asp Thr Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly
 65 70 75 80

Ile His Val Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr
 85 90 95

Thr Pro Asp Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val
 100 105 110

Gln His Thr Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn
 115 120 125

Val His Asn Pro Thr Gly Arg Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met
 130 135 140

Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser
 145 150 155 160

Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His
 165 170 175

Leu Pro Val Ala Asp Ala Val Ile His Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp
 180 185 190

Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu Ala Trp Thr Arg Gln Gln Asn
 195 200 205

410-1PCTST25.txt

Gln Trp Lys Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro
 210 215 220
 Thr Lys Asp Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val
 225 230 235 240
 Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp
 245 250 255
 Gln Tyr Val Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser
 260 265 270
 Gly Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp
 275 280 285
 Leu Thr Met Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg
 290 295 300
 Asn Gly Phe Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly
 305 310 315 320
 Lys Ile Ser His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His
 325 330 335
 Phe Gly Leu Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly
 340 345 350
 Asn Leu Leu Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile
 355 360 365
 Arg Glu Thr Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe
 370 375 380
 Phe Phe Asp Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu
 385 390 395 400
 His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr
 405 410 415
 Arg His Thr Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp
 420 425 430
 Asp Val Trp Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr
 435 440 445
 Glu Arg Lys Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala
 450 455 460
 Ser Thr Ser Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala
 465 470 475 480

410-1PCTST25.txt

Cys Thr Ser Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr
485 490 495

Val Ala Pro Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His
500 505 510

Asn Pro Ala Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala
515 520 525

Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys
530 535 540

Tyr Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala
545 550 555 560

Glu Leu Glu Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg
565 570 575

His Arg Gln Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys
580 585 590

Lys His Arg Gly Gly Ser Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu Ala Val
595 600 605

Leu Ala Val Val Val Ile Gly Ala Val Val Ala Thr Val Met Cys Arg
610 615 620

Arg Lys Ser Ser Gly Gly Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser
625 630 635 640

Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala
645 650

<210> 13
<211> 1923
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<400> 13
atgcgggtca cggcgccccg aaccctcatc ctgctgctct cgggagccct ggcctgacc 60
gagacctggg ccggctccct gcaggtcgac tctagaggat ccaccatgga gtcgcgcggt 120
cgccgttgct ccgaaatgat atccgtactg ggtcccatct cggggcacgt gctgaaagcc 180
gtgttttagtc gcggcgatac gccggtgctg ccgcacgaga cgcgactcct gcagacgggt 240
atccacgtac gcgtgagcca gccctcgctg atcttggtat cgcagtacac gcccgactcg 300
acgccatgcc accgcggcga caatcagctg cagggtgcagc acacgtactt tacgggcagc 360
gaggtggaga acgtgtcggt caacgtgcac aacccacagg gccgaagcat ctgcccagc 420
caggagccca tgtcgatcta tgtgtacgcg ctgccgctca agatgctgaa catccccagc 480
atcaacgtgc accactaccc gtcggcggcc gagcgcaaac accgacacct gcccgtagct 540

410-1PCTST25.txt

```

gacgctgtga ttcacgcgtc gggcaagcag atgtggcagg cgcgtctcac ggtctcggga    600
ctggcctgga cgcgtcagca gaaccagtgg aaagagcccg acgtctacta cacgtcagcg    660
ttcgtgtttc ccaccaagga cgtggcactg cggcacgtgg tgtgcgcgca cgagctgggt    720
tgctccatgg agaacacgcg cgcaaccaag atgcagggtga taggtgacca gtacgtcaag    780
gtgtacctgg agtccttctg cgaggacgtg ccctccggca agctctttat gcacgtcacg    840
ctgggctctg acgtggaaga ggacctgacg atgaccgcga acccgcaacc cttcatgcgc    900
ccccacgagc gcaacggctt tacggtgttg tgtcccaaaa atatgataat caaacggggc    960
aagatctcgc acatcatgct ggatgtggct tttacctcac acgagcattt tgggctgctg   1020
tgtcccaaga gcatcccggg cctgagcatc tcaggtaacc tgttgatgaa cgggcagcag   1080
atcttcctgg aggtacaagc catacgcgag accgtggaac tgcgtcagta cgatcccgctg   1140
gctgcgctct tctttttcga tatcgacttg ctgctgcagc gcgggcctca gtacagcgag   1200
cacccacact tcaccagcca gtatcgcatc cagggcaagc ttgagtaccg acacacctgg   1260
gaccggcacg acgaggggtg cggccaggcg gacgacgacg tctggaccag cggatcggac   1320
tccgacgaag aactcgtaac caccgagcgc aagacgcccc gcgtcaccgg cggcggcgcc   1380
atggcgggcg cctccacttc cgcgggccgc aaacgcaa atcagcatcctc ggcgacggcg   1440
tgcacgtcgg gcgttatgac acgcggccgc cttaaggccg agtccaccgt cgcgcccga   1500
gaggacaccg acgaggattc cgacaacgaa atccacaatc cggccgtgtt cacctggccg   1560
ccctggcagg cggcatcctt ggcccgaac ctgggtgcca tgggtggctac ggttcagggt   1620
cagaatctga agtaccagga attcttctgg gacgccaacg acatctaccg catcttcgcc   1680
gaattggaag gcgtatggca gcccgtgctg caacccaaac gtcgccgcca ccggcaagac   1740
gccttgcccg ggccatgcat cgcctcgacg cccaaaaagc accgaggtgg atcccagagc   1800
aagatgctga gtggagtcgg gggctttgtg ctgggcctgc tcttccttgg ggccgggctg   1860
ttcatctact tcaggaatca gaaaggacac tctggacttc agccaagagg attcctgagc   1920
tga                                                                    1923

```

<210> 14
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> künstliche Sequenz

<400> 14

Met Arg Val Thr Ala Pro Arg Thr Leu Ile Leu Leu Leu Ser Gly Ala
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Thr Glu Thr Trp Ala Gly Ser Leu Gln Val Asp Ser Arg
 20 25 30

Gly Ser Thr Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser
 35 40 45

410-1PCTST25.txt

Val Leu Gly Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg
 50 55 60
 Gly Asp Thr Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly
 65 70 75 80
 Ile His Val Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr
 85 90 95
 Thr Pro Asp Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val
 100 105 110
 Gln His Thr Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn
 115 120 125
 Val His Asn Pro Thr Gly Arg Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met
 130 135 140
 Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser
 145 150 155 160
 Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His
 165 170 175
 Leu Pro Val Ala Asp Ala Val Ile His Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp
 180 185 190
 Gln Ala Arg Leu Thr Val Ser Gly Leu Ala Trp Thr Arg Gln Gln Asn
 195 200 205
 Gln Trp Lys Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro
 210 215 220
 Thr Lys Asp Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val
 225 230 235 240
 Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp
 245 250 255
 Gln Tyr Val Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser
 260 265 270
 Gly Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp
 275 280 285
 Leu Thr Met Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg
 290 295 300
 Asn Gly Phe Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly
 305 310 315 320

410-1PCTST25.txt

Lys Ile Ser His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His
 325 330 335
 Phe Gly Leu Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly
 340 345 350
 Asn Leu Leu Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile
 355 360 365
 Arg Glu Thr Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe
 370 375 380
 Phe Phe Asp Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu
 385 390 395 400
 His Pro Thr Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr
 405 410 415
 Arg His Thr Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp
 420 425 430
 Asp Val Trp Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr
 435 440 445
 Glu Arg Lys Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala
 450 455 460
 Ser Thr Ser Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala
 465 470 475 480
 Cys Thr Ser Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr
 485 490 495
 Val Ala Pro Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His
 500 505 510
 Asn Pro Ala Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala
 515 520 525
 Arg Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys
 530 535 540
 Tyr Gln Glu Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala
 545 550 555 560
 Glu Leu Glu Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg
 565 570 575
 His Arg Gln Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys
 580 585 590

410-1PCTST25.txt

Lys His Arg Gly Gly Ser Gln Ser Lys Met Leu Ser Gly Val Gly Gly
 595 600 605

Phe Val Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gly Ala Gly Leu Phe Ile Tyr Phe
 610 615 620

Arg Asn Gln Lys Gly His Ser Gly Leu Gln Pro Arg Gly Phe Leu Ser
 625 630 635 640

<210> 15
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu
 1 5 10 15

Val Leu Phe Gly Ala Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met
 20 25 30

Trp Arg Arg Lys Ser Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala
 35 40 45

Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala Cys
 50 55 60

Lys Val
 65

<210> 16
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp
 1 5 10 15

Val Ser Leu Thr Ala Cys Lys Val
 20

<210> 17
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Pro Ser Ser Gln Ser Thr Val Pro Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu
 1 5 10 15

Ala Val Leu Ala Val Val Val Ile Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met
 20 25 30

410-1PCTST25.txt

Cys Arg Arg Lys Ser Ser Gly Gly Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Gln Ala
 35 40 45

Ala Cys Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu Thr Ala
 50 55 60

<210> 18
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Cys Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp
 1 5 10 15

Val Ser Leu Thr Ala
 20

<210> 19
 <211> 67
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu
 1 5 10 15

Ala Val Leu Ala Val Leu Ala Val Leu Gly Ala Met Val Ala Val Val
 20 25 30

Met Cys Arg Arg Lys Ser Ser Gly Gly Lys Gly Gly Ser Cys Ser Gln
 35 40 45

Ala Ala Ser Ser Asn Ser Ala Gln Gly Ser Asp Glu Ser Leu Ile Ala
 50 55 60

Cys Lys Ala
 65

<210> 20
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Ala Gln Gly Ser Asp Glu Ser Leu Ile Ala Cys Lys Ala
 1 5 10

<210> 21
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

410-1PCTST25.txt

<400> 21

Pro Ala Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu
 1 5 10 15

Val Leu Leu Gly Ser Val Val Ser Gly Ala Val Val Ala Ala Val Ile
 20 25 30

Trp Arg Lys Lys Ser Ser Gly Gly Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Lys Ala
 35 40 45

Glu Trp Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Glu Ser His Ser Leu
 50 55 60

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gly Ser Tyr Ser Lys Ala Glu Trp Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Glu
 1 5 10 15

Ser His Ser Leu
 20

<210> 23

<211> 66

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Gln Ser Pro Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Val Ala Gly Leu
 1 5 10 15

Val Val Leu Gly Ala Val Val Thr Gly Ala Val Val Ala Ala Val Met
 20 25 30

Trp Arg Lys Lys Ser Ser Asp Arg Asn Arg Gly Ser Tyr Ser Gln Ala
 35 40 45

Ala Val Thr Asp Ser Ala Gln Gly Ser Gly Val Ser Leu Thr Ala Asn
 50 55 60

Lys Val
 65

<210> 24

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Asn Arg Gly Ser Tyr Ser Gln Ala Ala Val Thr Asp Ser Ala Gln

1 5 410-1PCTST25.txt 15
10

Gly ser Gly val Ser Leu Thr Ala Asn Lys Val
20 25

<210> 25
<211> 37
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 25

val val Cys Ala Leu Gly Leu Thr val Gly Leu Val Gly Ile Ile Ile
1 5 10 15

Gly Thr Ile Phe Ile Ile Lys Gly Leu Arg Lys Ser Asn Ala Ala Glu
20 25 30

Arg Arg Gly Pro Leu
35

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 26

Arg Lys Ser Asn Ala Ala Glu Arg Arg Gly Pro Leu
1 5 10

<210> 27
<211> 38
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 27

Met Leu Ser Gly val Gly Gly Phe val Leu Gly Leu Leu Phe Leu Ala
1 5 10 15

Gly Leu Phe Ile Tyr Phe Arg Asn Gln Lys Gly His Ser Gly Leu Gln
20 25 30

Pro Arg Gly Phe Leu Ser
35

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 28

Gly His Ser Gly Leu Gln Pro Arg Gly Phe Leu Ser
1 5 10

<210> 29

410-1PCTST25.txt

<211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Val Val Cys Ala Leu Gly Leu Ser Val Gly Leu Met Gly Ile Val Val
 1 5 10 15

Gly Thr Val Phe Ile Ile Gln Gly Leu Arg Ser Val Gly Ala Ser Arg
 20 25 30

His Gln Gly Pro Leu
 35

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Val Gly Ala Ser Arg His Gln Gly Pro Leu
 1 5 10

<210> 31
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Met Leu Ser Gly Ile Gly Gly Phe Val Leu Gly Leu Ile Phe Leu Gly
 1 5 10 15

Leu Gly Leu Ile Ile His His Arg Ser Gln Lys Gly Leu Leu His
 20 25 30

<210> 32
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Arg Ser Gln Lys Gly Leu Leu His
 1 5

<210> 33
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Val Leu Cys Ala Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Val Gly Ile Ile Val
 1 5 10 15

Gly Thr Val Leu Ile Ile Lys Ser Leu Arg Ser Gly His Asp Pro Arg
 20 25 30

410-1PCTST25.txt

Ala Gln Gly Thr Leu
35

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Arg Ser Gly His Asp Pro Arg Ala Gln Gly Thr Leu
1 5 10

<210> 35
<211> 33
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Thr Leu Thr Gly Ala Gly Gly Phe Val Leu Gly Leu Ile Ile Cys Gly
1 5 10 15

Val Gly Ile Phe Met His Arg Arg Ser Lys Lys Val Gln Arg Gly Ser
20 25 30

Ala

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Ser Lys Lys Val Gln Arg Gly Ser Ala
1 5

<210> 37
<211> 26
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Phe Ile Ile Leu Ala Val Ile Val Pro Leu Leu Leu Leu Ile Gly Leu
1 5 10 15

Ala Leu Trp Phe Arg Lys Arg Cys Phe Cys
20 25

<210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

410-1PCTST25.txt

Arg Lys Arg Cys Phe Cys
1 5

<210> 39
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Ile Val Leu Ala Ile Ile Val Pro Ser Leu Leu Leu Leu Leu Cys Leu
1 5 10 15

Ala Leu Trp Tyr Met Arg Arg Arg Ser Tyr Gln Asn Ile Pro
20 25 30

<210> 40
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Arg Arg Arg Ser Tyr Gln Asn Ile Pro
1 5

<210> 41
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Trp Ile Ala Leu Val Val Ile Val Pro Leu Val Ile Leu Ile Val Leu
1 5 10 15

Val Leu Trp Phe Lys Lys His Cys Ser Tyr Gln Asp Ile Leu
20 25 30

<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Lys Lys His Cys Ser Tyr Gln Asp Ile Leu
1 5 10

<210> 43
<211> 250
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Met Ala Ala Gly Thr Ser Ser Tyr Trp Glu Asp Leu Arg Lys Gln Ala
1 5 10 15

410-1PCTST25.txt

Arg Gln Leu Glu Asn Glu Leu Asp Leu Lys Leu Val Ser Phe Ser Lys
 20 25 30

Leu Cys Thr Ser Tyr Ser His Ser Ser Thr Arg Asp Gly Arg Arg Asp
 35 40 45

Arg Tyr Ser Ser Asp Thr Thr Pro Leu Leu Asn Gly Ser Ser Gln Asp
 50 55 60

Arg Met Phe Glu Thr Met Ala Ile Glu Ile Glu Gln Leu Leu Ala Arg
 65 70 75 80

Leu Thr Gly Val Asn Asp Lys Met Ala Glu Tyr Thr Asn Ser Ala Gly
 85 90 95

Val Pro Ser Leu Asn Ala Ala Leu Met His Thr Leu Gln Arg His Arg
 100 105 110

Asp Ile Leu Gln Asp Tyr Thr His Glu Phe His Lys Thr Lys Ala Asn
 115 120 125

Phe Met Ala Ile Arg Glu Arg Glu Asn Leu Met Gly Ser Val Arg Lys
 130 135 140

Asp Ile Glu Ser Tyr Lys Ser Gly Ser Gly Val Asn Asn Arg Arg Thr
 145 150 155 160

Glu Leu Phe Leu Lys Glu His Asp His Leu Arg Asn Ser Asp Arg Leu
 165 170 175

Ile Glu Glu Thr Ile Ser Ile Ala Met Ala Thr Lys Glu Asn Met Thr
 180 185 190

Ser Gln Arg Gly Met Leu Lys Ser Ile His Ser Lys Met Asn Thr Leu
 195 200 205

Ala Asn Arg Phe Pro Ala Val Asn Ser Leu Ile Gln Arg Ile Asn Leu
 210 215 220

Arg Lys Arg Arg Asp Ser Leu Ile Leu Gly Gly Val Ile Gly Ile Cys
 225 230 235 240

Thr Ile Leu Leu Leu Leu Tyr Ala Phe His
 245 250

<210> 44
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Met Gly Ala Ser Leu Thr Ser Pro Gly Thr Gln Glu Lys Leu Ile Arg

21/41

410-1PCTST25.txt

Ser Leu Gln Lys Val His Asn Gly Met Asp Asp Leu Ile Leu Asp Gly
130 135 140

His Asn Ile Leu Asp Gly Leu Arg Thr Gln Arg Leu Thr Leu Lys Gly
145 150 155 160

Thr Gln Lys Lys Ile Leu Asp Ile Ala Asn Met Leu Gly Leu Ser Asn
165 170 175

Thr Val Met Arg Leu Ile Glu Lys Arg Ala Phe Gln Asp Lys Tyr Phe
180 185 190

Met Ile Gly Gly Met Leu Leu Thr Cys Val Val Met Phe Leu Val Val
195 200 205

Gln Tyr Leu Thr
210

<210> 46
<211> 172
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Met Ser Val Pro Gly Pro Ser Ser Pro Asp Gly Ala Leu Thr Arg Pro
1 5 10 15

Pro Tyr Cys Leu Glu Ala Gly Glu Pro Thr Pro Gly Leu Ser Asp Thr
20 25 30

Ser Pro Asp Glu Gly Leu Ile Glu Asp Leu Thr Ile Glu Asp Lys Ala
35 40 45

Val Glu Gln Leu Ala Glu Gly Leu Leu Ser His Tyr Leu Pro Asp Leu
50 55 60

Gln Arg Ser Lys Gln Ala Leu Gln Glu Leu Thr Gln Asn Gln Val Val
65 70 75 80

Leu Leu Asp Thr Leu Glu Gln Glu Ile Ser Lys Phe Lys Glu Cys His
85 90 95

Ser Met Leu Asp Ile Asn Ala Leu Phe Ala Glu Ala Lys His Tyr His
100 105 110

Ala Lys Leu Val Asn Ile Arg Lys Glu Met Leu Met Leu His Glu Lys
115 120 125

Thr Ser Lys Leu Lys Lys Arg Ala Leu Lys Leu Gln Gln Lys Arg Gln
130 135 140

410-1PCTST25.txt

Lys Glu Glu Leu Glu Arg Glu Gln Gln Arg Glu Lys Glu Phe Glu Arg
 145 150 155 160

Glu Lys Gln Leu Thr Ala Arg Pro Ala Lys Arg Met
 165 170

<210> 47
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

Met Ser Cys Arg Asp Arg Thr Gln Glu Phe Leu Ser Ala Cys Lys Ser
 1 5 10 15

Leu Gln Thr Arg Gln Asn Gly Ile Gln Thr Asn Lys Pro Ala Leu Arg
 20 25 30

Ala Val Arg Gln Arg Ser Glu Phe Thr Leu Met Ala Lys Arg Ile Gly
 35 40 45

Lys Asp Leu Ser Asn Thr Phe Ala Lys Leu Glu Lys Leu Thr Ile Leu
 50 55 60

Ala Lys Arg Lys Ser Leu Phe Asp Asp Lys Ala Val Glu Ile Glu Glu
 65 70 75 80

Leu Thr Tyr Ile Ile Lys Gln Asp Ile Asn Ser Leu Asn Lys Gln Ile
 85 90 95

Ala Gln Leu Gln Asp Phe Val Arg Ala Lys Gly Ser Gln Ser Gly Arg
 100 105 110

His Leu Gln Thr His Ser Asn Thr Ile Val Val Ser Leu Gln Ser Lys
 115 120 125

Leu Ala Ser Met Ser Asn Asp Phe Lys Ser Val Leu Glu Val Arg Thr
 130 135 140

Glu Asn Leu Lys Gln Gln Arg Ser Arg Arg Glu Gln Phe Ser Arg Ala
 145 150 155 160

Pro Val Ser Ala Leu Pro Leu Ala Pro Asn His Leu Gly Gly Gly Ala
 165 170 175

Val Val Leu Gly Ala Glu Ser His Ala Ser Lys Asp Val Ala Ile Asp
 180 185 190

Met Met Asp Ser Arg Thr Ser Gln Gln Leu Gln Leu Ile Asp Glu Gln
 195 200 205

410-1PCTST25.txt

Asp Ser Tyr Ile Gln Ser Arg Ala Asp Thr Met Gln Asn Ile Glu Ser
 210 215 220

Thr Ile Val Glu Leu Gly Ser Ile Phe Gln Gln Leu Ala His Met Val
 225 230 235 240

Lys Glu Gln Glu Glu Thr Ile Gln Arg Ile Asp Glu Asn Val Leu Gly
 245 250 255

Ala Gln Leu Asp Val Glu Ala Ala His Ser Glu Ile Leu Lys Tyr Phe
 260 265 270

Gln Ser Val Thr Ser Asn Arg Trp Leu Met Val Lys Ile Phe Leu Ile
 275 280 285

Leu Ile Val Phe Phe Ile Ile Phe Val Val Phe Leu Ala
 290 295 300

<210> 48
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

Met Ser Met Glu Asp Pro Phe Phe Val Val Lys Gly Glu Val Gln Lys
 1 5 10 15

Ala Val Asn Thr Ala Gln Gly Leu Phe Gln Arg Trp Thr Glu Leu Leu
 20 25 30

Gln Asp Pro Ser Thr Ala Thr Arg Glu Glu Ile Asp Trp Thr Thr Asn
 35 40 45

Glu Leu Arg Asn Asn Leu Arg Ser Ile Glu Trp Asp Leu Glu Asp Leu
 50 55 60

Asp Glu Thr Ile Ser Ile Val Glu Ala Asn Pro Arg Lys Phe Asn Leu
 65 70 75 80

Asp Ala Thr Glu Leu Ser Ile Arg Lys Ala Phe Ile Thr Ser Thr Arg
 85 90 95

Gln Val Val Arg Asp Met Lys Asp Gln Met Ser Thr Ser Ser Val Gln
 100 105 110

Ala Leu Ala Glu Arg Lys Asn Arg Gln Ala Leu Leu Gly Asp Ser Gly
 115 120 125

Ser Gln Asn Trp Ser Thr Gly Thr Thr Asp Lys Tyr Gly Arg Leu Asp
 130 135 140

Arg Glu Leu Gln Arg Ala Asn Ser His Phe Ile Glu Glu Gln Gln Ala

410-1PCTST25.txt

Trp Glu Ser Gln Thr Gln Pro Gln Val Gln Val Gln Asp Glu Glu Ile
145 150 155 160

Thr Glu Asp Asp Leu Arg Leu Ile His Glu Arg Glu Ser Ser Ile Arg
165 170 175

Gln Leu Glu Ala Asp Ile Met Asp Ile Asn Glu Ile Phe Lys Asp Leu
180 185 190

Gly Met Met Ile His Glu Gln Gly Asp Val Ile Asp Ser Ile Glu Ala
195 200 205

Asn Val Glu Asn Ala Glu Val His Val Gln Gln Ala Asn Gln Gln Leu
210 215 220

Ser Arg Ala Ala Asp Tyr Gln Arg Lys Ser Arg Lys Thr Leu Cys Ile
225 230 235 240

Ile Ile Leu Ile Leu Val Ile Gly Val Ala Ile Ile Ser Leu Ile Ile
245 250 255

Trp Gly Leu Asn His
260

<210> 50
<211> 236
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Ala Pro Asp Pro Trp Phe Ser Thr Tyr Asp Ser Thr Cys Gln Ile
1 5 10 15

Ala Gln Glu Ile Ala Glu Lys Ile Gln Gln Arg Asn Gln Tyr Glu Arg
20 25 30

Lys Gly Glu Lys Ala Pro Lys Leu Thr Val Thr Ile Arg Ala Leu Leu
35 40 45

Gln Asn Leu Lys Glu Lys Ile Ala Leu Leu Lys Asp Leu Leu Leu Arg
50 55 60

Ala Val Ser Thr His Gln Ile Thr Gln Leu Glu Gly Asp Arg Arg Gln
65 70 75 80

Asn Leu Leu Asp Asp Leu Val Thr Arg Glu Arg Leu Leu Leu Ala Ser
85 90 95

Phe Lys Asn Glu Gly Ala Glu Pro Asp Leu Ile Arg Ser Ser Leu Met
100 105 110

410-1PCTST25.txt

Ser Glu Glu Ala Lys Arg Gly Ala Pro Asn Pro Trp Leu Phe Glu Glu
 115 120 125

Pro Glu Glu Thr Arg Gly Leu Gly Phe Asp Glu Ile Arg Gln Gln Gln
 130 135 140

Gln Lys Ile Ile Gln Glu Gln Asp Ala Gly Leu Asp Ala Leu Ser Ser
 145 150 155 160

Ile Ile Ser Arg Gln Lys Gln Met Gly Gln Glu Ile Gly Asn Glu Leu
 165 170 175

Asp Glu Gln Asn Glu Ile Ile Asp Asp Leu Ala Asn Leu Val Glu Asn
 180 185 190

Thr Asp Glu Lys Leu Arg Asn Glu Thr Arg Arg Val Asn Met Val Asp
 195 200 205

Arg Lys Ser Ala Ser Cys Gly Met Ile Met Val Ile Leu Leu Leu Leu
 210 215 220

Val Ala Ile Val Val Val Ala Val Trp Pro Thr Asn
 225 230 235

<210> 51
 <211> 200
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

Met Ser Leu Glu Asp Pro Phe Phe Val Val Arg Gly Glu Val Gln Lys
 1 5 10 15

Ala Val Asn Thr Ala Arg Gly Leu Tyr Gln Arg Trp Cys Glu Leu Leu
 20 25 30

Gln Glu Ser Ala Ala Val Gly Arg Glu Glu Leu Asp Trp Thr Thr Asn
 35 40 45

Glu Leu Arg Asn Gly Leu Arg Ser Ile Glu Trp Asp Leu Glu Asp Leu
 50 55 60

Glu Glu Thr Ile Gly Ile Val Glu Ala Asn Pro Gly Lys Pro Ala Ala
 65 70 75 80

Gln Lys Ser Pro Ser Asp Leu Leu Asp Ala Ser Ala Val Ser Ala Thr
 85 90 95

Ser Arg Tyr Ile Glu Glu Gln Gln Ala Thr Gln Gln Leu Ile Met Asp
 100 105 110

410-1PCTST25.txt

Glu Gln Asp Gln Gln Leu Glu Met Val Ser Gly Ser Ile Gln Val Leu
 115 120 125

Lys His Met Ser Gly Arg Val Gly Glu Glu Leu Asp Glu Gln Gly Ile
 130 135 140

Met Leu Asp Ala Phe Ala Gln Glu Met Asp His Thr Gln Ser Arg Met
 145 150 155 160

Asp Gly Val Leu Arg Lys Leu Ala Lys Val Ser His Met Thr Ser Asp
 165 170 175

Arg Arg Gln Trp Cys Ala Ile Ala Val Leu Val Gly Val Leu Leu Leu
 180 185 190

Val Leu Ile Leu Leu Phe Ser Leu
 195 200

<210> 52
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52

Met Ser Leu Glu Asp Pro Phe Phe Val Val Arg Gly Glu Val Gln Lys
 1 5 10 15

Ala Val Asn Thr Ala Arg Gly Leu Tyr Gln Arg Trp Cys Glu Leu Leu
 20 25 30

Gln Glu Ser Ala Ala Val Gly Arg Glu Glu Leu Asp Trp Thr Thr Asn
 35 40 45

Glu Leu Arg Asn Gly Leu Arg Ser Ile Glu Trp Asp Leu Glu Asp Leu
 50 55 60

Glu Glu Thr Ile Gly Ile Val Glu Ala Asn Pro Gly Lys Phe Lys Leu
 65 70 75 80

Pro Ala Gly Asp Leu Gln Glu Arg Lys Val Phe Val Glu Arg Met Arg
 85 90 95

Glu Ala Val Gln Glu Met Lys Asp His Met Val Ser Pro Thr Ala Val
 100 105 110

Ala Phe Leu Glu Arg Asn Asn Arg Glu Ile Leu Ala Gly Lys Pro Ala
 115 120 125

Ala Gln Lys Ser Pro Ser Asp Leu Leu Asp Ala Ser Ala Val Ser Ala
 130 135 140

Thr Ser Arg Tyr Ile Glu Glu Gln Gln Ala Thr Gln Gln Leu Ile Met

410-1PCTST25.txt

145 150 155 160
 Asp Glu Gln Asp Gln Gln Leu Glu Met Val Ser Gly Ser Ile Gln Val
 165 170 175
 Leu Lys His Met Ser Gly Arg Val Gly Glu Glu Leu Asp Glu Gln Gly
 180 185 190
 Ile Met Leu Asp Ala Phe Ala Gln Glu Met Asp His Thr Gln Ser Arg
 195 200 205
 Met Asp Gly Val Leu Arg Lys Leu Ala Lys Val Ser His Met Thr Ser
 210 215 220
 Asp Arg Arg Gln Trp Cys Ala Ile Ala Val Leu Val Gly Val Leu Leu
 225 230 235 240
 Leu Val Leu Ile Leu Leu Phe Ser Leu
 245

<210> 53
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53

Met Lys Asp Arg Leu Ala Glu Leu Leu Asp Leu Ser Lys Gln Tyr Asp
 1 5 10 15
 Gln Gln Phe Pro Asp Gly Asp Asp Glu Phe Asp Ser Pro His Glu Asp
 20 25 30
 Ile Val Phe Glu Thr Asp His Ile Leu Glu Ser Leu Tyr Arg Asp Ile
 35 40 45
 Arg Asp Ile Gln Asp Glu Asn Gln Leu Leu Val Ala Asp Val Lys Arg
 50 55 60
 Leu Gly Lys Gln Asn Ala Arg Phe Leu Thr Ser Met Arg Arg Leu Ser
 65 70 75 80
 Ser Ile Lys Arg Asp Thr Asn Ser Ile Ala Lys Ala Phe Arg Ala Arg
 85 90 95
 Gly Glu Val Ile His Cys Lys Leu Arg Ala Met Lys Glu Leu Ser Glu
 100 105 110
 Ala Ala Glu Ala Gln His Gly Pro His Ser Ala Val Ala Arg Ile Ser
 115 120 125
 Arg Ala Gln Tyr Asn Ala Leu Thr Leu Thr Phe Gln Arg Ala Met His
 130 135 140

410-1PCTST25.txt

Asp Tyr Asn Gln Ala Glu Met Lys Gln Arg Asp Asn Cys Lys Ile Arg
145 150 155 160

Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Met Gly Lys Glu Val Ser Gly Asp Gln
165 170 175

Ile Glu Asp Met Phe Glu Gln Gly Lys Trp Asp Val Phe Ser Glu Asn
180 185 190

Leu Leu Ala Asp Val Lys Gly Arg Gly Pro Pro Thr Thr Arg Ser Arg
195 200 205

Ala Ala Thr Ala Asn Cys Cys Ala Trp Arg Ala Ala Ile Arg Asp Val
210 215 220

His Glu Leu Phe Leu Gln Met Ala Val Leu Val Glu Lys Gln Ala Asp
225 230 235 240

Thr Leu Asn Val Ile Glu Leu Asn Val Gln Lys Thr Val Asp Tyr Thr
245 250 255

Gly Gln Ala Lys Ala Gln Val Arg Lys Ala Val Gln Tyr Glu Glu Lys
260 265 270

Asn Pro Cys Arg Thr Leu Cys Cys Phe Cys Cys Pro Cys Leu Lys
275 280 285

<210> 54
<211> 276
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Met Ser Tyr Gly Pro Leu Asp Met Tyr Arg Asn Pro Gly Pro Ser Gly
1 5 10 15

Pro Gln Leu Arg Asp Phe Ser Ser Ile Ile Gln Thr Cys Ser Gly Asn
20 25 30

Ile Gln Arg Ile Ser Gln Ala Thr Ala Gln Ile Lys Asn Leu Met Ser
35 40 45

Gln Leu Gly Thr Lys Gln Asp Ser Ser Lys Leu Gln Glu Asn Leu Gln
50 55 60

Gln Leu Gln His Ser Thr Asn Gln Leu Ala Lys Glu Thr Asn Glu Leu
65 70 75 80

Leu Lys Glu Leu Gly Ser Leu Pro Leu Pro Leu Ser Thr Ser Glu Gln
85 90 95

410-1PCTST25.txt

Arg Gln Gln Arg Leu Gln Lys Glu Arg Leu Met Asn Asp Phe Ser Ala
 100 105 110

Ala Leu Asn Asn Phe Gln Ala Val Gln Arg Arg Val Ser Glu Lys Glu
 115 120 125

Lys Glu Ser Ile Ala Arg Ala Arg Ala Gly Ser Arg Leu Ser Ala Glu
 130 135 140

Glu Arg Gln Arg Glu Glu Gln Leu Val Ser Phe Asp Ser His Glu Glu
 145 150 155 160

Trp Asn Gln Met Gln Ser Gln Glu Asp Glu Val Ala Ile Thr Glu Gln
 165 170 175

Asp Leu Glu Leu Ile Lys Glu Arg Glu Thr Ala Ile Arg Gln Leu Glu
 180 185 190

Ala Asp Ile Leu Asp Val Asn Gln Ile Phe Lys Asp Leu Ala Met Met
 195 200 205

Ile His Asp Gln Gly Asp Leu Ile Asp Ser Ile Glu Ala Asn Val Glu
 210 215 220

Ser Ser Glu Val His Val Glu Arg Ala Thr Glu Gln Leu Gln Arg Ala
 225 230 235 240

Ala Tyr Tyr Gln Lys Lys Ser Arg Lys Lys Met Cys Ile Leu Val Leu
 245 250 255

Val Leu Ser Val Ile Ile Leu Ile Leu Gly Leu Ile Ile Trp Leu Val
 260 265 270

Tyr Lys Thr Lys
 275

<210> 55
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55

Met Ser Glu Asp Glu Glu Lys Val Lys Leu Arg Arg Leu Glu Pro Ala
 1 5 10 15

Ile Gln Lys Phe Ile Lys Ile Val Ile Pro Thr Asn Leu Glu Arg Leu
 20 25 30

Arg Lys His Gln Ile Asn Ile Glu Lys Tyr Gln Arg Cys Arg Ile Trp
 35 40 45

410-1PCTST25.txt

Asp Lys Leu His Glu Glu His Ile Asn Ala Gly Arg Thr Val Gln Gln
 50 55 60

Leu Arg Ser Asn Ile Arg Glu Ile Glu Lys Leu Cys Leu Lys Val Arg
 65 70 75 80

Lys Asp Asp Leu Val Leu Leu Lys Arg Met Ile Asp Pro Val Lys Glu
 85 90 95

Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Glu Phe Leu Gln Leu His Leu Glu Ser
 100 105 110

Val Glu Glu Leu Lys Lys Gln Phe Asn Asp Glu Glu Thr Leu Leu Gln
 115 120 125

Pro Pro Leu Thr Arg Ser Met Thr Val Gly Gly Ala Phe His Thr Thr
 130 135 140

Glu Ala Glu Ala Ser Ser Gln Ser Leu Thr Gln Ile Tyr Ala Leu Pro
 145 150 155 160

Glu Ile Pro Gln Asp Gln Asn Ala Ala Glu Ser Arg Glu Thr Leu Glu
 165 170 175

Ala Asp Leu Ile Glu Leu Ser Gln Leu Val Thr Asp Phe Ser Leu Leu
 180 185 190

Val Asn Ser Gln Gln Glu Lys Ile Asp Ser Ile Ala Asp His Val Asn
 195 200 205

Ser Ala Ala Val Asn Val Glu Glu Gly Thr Lys Asn Leu Gly Lys Ala
 210 215 220

Ala Lys Tyr Lys Leu Ala Ala Leu Pro Val Ala Gly Ala Leu Ile Gly
 225 230 235 240

Gly Met Val Gly Gly Pro Ile Gly Leu Leu Ala Cys Phe Lys Val Ala
 245 250 255

Gly Ile Ala Ala Ala Leu Gly Gly Gly Val Leu Gly Phe Thr Gly Gly
 260 265 270

Lys Leu Ile Gln Arg Lys Lys Gln Lys Met Met Glu Lys Leu Thr Ser
 275 280 285

Ser Cys Pro Asp Leu Pro Ser Gln Thr Asp Lys Lys Cys Ser
 290 295 300

<210> 56
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

410-1PCTST25.txt

<400> 56

Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Ala Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Glu
 1 5 10 15
 Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu
 20 25 30
 Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val
 35 40 45
 Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp
 50 55 60
 Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
 65 70 75 80
 Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met
 85 90 95
 Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
 100 105 110
 Tyr Phe Ser Ser
 115

<210> 57

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Met Ser Thr Gly Pro Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn Arg Arg Leu Gln
 1 5 10 15
 Gln Thr Gln Asn Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val Asn
 20 25 30
 Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp Asp
 35 40 45
 Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser Ala
 50 55 60
 Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Cys Lys Met Trp Ala
 65 70 75 80
 Ile Gly Ile Thr Val Leu Val Ile Phe Ile Ile Ile Ile Ile Val Trp
 85 90 95
 Val Val Ser Ser
 100

410-1PCTST25.txt

<210> 58
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Met Pro Pro Lys Phe Lys Arg His Leu Asn Asp Asp Asp Val Thr Gly
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ser Glu Arg Arg Asn Leu Leu Glu Asp Asp Ser Asp Glu
 20 25 30

Glu Glu Asp Phe Phe Leu Arg Gly Pro Ser Gly Pro Arg Phe Gly Pro
 35 40 45

Arg Asn Asp Lys Ile Lys His Val Gln Asn Gln Val Asp Glu Val Ile
 50 55 60

Asp Val Met Pro Glu Asn Ile Thr Lys Val Ile Glu Arg Gly Glu Arg
 65 70 75 80

Leu Asp Glu Leu Gln Asp Lys Ser Glu Ser Leu Ser Asp Asn Ala Thr
 85 90 95

Ala Phe Ser Asn Arg Ser Lys Gln Leu Arg Arg Gln Met Trp Trp Arg
 100 105 110

Gly Cys Lys Ile Lys Ala Ile Met Ala Leu Val Ala Ala Ile Leu Leu
 115 120 125

Leu Val Ile Ile Ile Leu Ile Val Met Lys Tyr Arg Thr
 130 135 140

<210> 59
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59

Met Ala Ile Leu Phe Ala Val Val Ala Arg Gly Thr Thr Ile Leu Ala
 1 5 10 15

Lys His Ala Trp Cys Gly Gly Asn Phe Leu Glu Val Thr Glu Gln Ile
 20 25 30

Leu Ala Lys Ile Pro Ser Glu Asn Asn Lys Leu Thr Tyr Ser His Gly
 35 40 45

Asn Tyr Leu Phe His Tyr Ile Cys Gln Asp Arg Ile Val Tyr Leu Cys
 50 55 60

410-1PCTST25.txt

Ile Thr Asp Asp Asp Phe Glu Arg Ser Arg Ala Phe Asn Phe Leu Asn
65 70 75 80

Glu Ile Lys Lys Arg Phe Gln Thr Thr Tyr Gly Ser Arg Ala Gln Thr
85 90 95

Ala Leu Pro Tyr Ala Met Asn Ser Glu Phe Ser Ser Val Leu Ala Ala
100 105 110

Gln Leu Lys His His Ser Glu Asn Lys Gly Leu Asp Lys Val Met Glu
115 120 125

Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Leu Lys Gly Ile Met Val Arg Asn Ile
130 135 140

Asp Leu Val Ala Gln Arg Gly Glu Arg Leu Glu Leu Leu Ile Asp Lys
145 150 155 160

Thr Glu Asn Leu Val Asp Ser Ser Val Thr Phe Lys Thr Thr Ser Arg
165 170 175

Asn Leu Ala Arg Ala Met Cys Met Lys Asn Leu Lys Leu Thr Ile Ile
180 185 190

Ile Ile Ile Val Ser Ile Val Phe Ile Tyr Ile Ile Val Ser Pro Leu
195 200 205

Cys Gly Gly Phe Thr Trp Pro Ser Cys Val Lys Lys
210 215 220

<210> 60
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

Met Glu Glu Ala Ser Glu Gly Gly Gly Asn Asp Arg Val Arg Asn Leu
1 5 10 15

Gln Ser Glu Val Glu Gly Val Lys Asn Ile Met Thr Gln Asn Val Glu
20 25 30

Arg Ile Leu Ala Arg Gly Glu Asn Leu Glu His Leu Arg Asn Lys Thr
35 40 45

Glu Asp Leu Glu Ala Thr Ser Glu His Phe Lys Thr Thr Ser Gln Lys
50 55 60

Val Ala Arg Lys Phe Trp Trp Lys Asn Val Lys Met Ile Val Leu Ile
65 70 75 80

Cys Val Ile Val Phe Ile Ile Ile Leu Phe Ile Val Leu Phe Ala Thr

85

410-1PCTST25.txt
90

95

Gly Ala Phe Ser
100<210> 61
<211> 203
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Met Ser Ser Asp Phe Glu Gly Tyr Glu Gln Asp Phe Ala Val Leu Thr
1 5 10 15Ala Glu Ile Thr Ser Lys Ile Ala Arg Val Pro Arg Leu Pro Pro Asp
20 25 30Glu Lys Lys Gln Met Val Ala Asn Val Glu Lys Gln Leu Glu Glu Ala
35 40 45Lys Glu Leu Leu Glu Gln Met Asp Leu Glu Val Arg Glu Ile Pro Pro
50 55 60Gln Ser Arg Gly Met Tyr Ser Asn Arg Met Arg Ser Tyr Lys Gln Glu
65 70 75 80Met Gly Lys Leu Glu Thr Asp Phe Lys Arg Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
85 90 95Asp Glu Val Arg Asn Glu Leu Leu Gly Asp Asp Gly Asn Ser Ser Glu
100 105 110Asn Gln Arg Ala His Leu Leu Asp Asn Thr Glu Arg Leu Glu Arg Ser
115 120 125Ser Arg Arg Leu Glu Ala Gly Tyr Gln Ile Ala Val Glu Thr Glu Gln
130 135 140Ile Gly Gln Glu Met Leu Glu Asn Leu Ser His Asp Arg Glu Lys Ile
145 150 155 160Gln Arg Ala Arg Glu Arg Leu Arg Glu Thr Asp Ala Asn Leu Gly Lys
165 170 175Ser Ser Arg Ile Leu Thr Gly Met Leu Arg Arg Gly Cys Ser Val Lys
180 185 190Lys Gln Cys Asn Leu Ser Leu Ala Pro Lys Ala
195 200<210> 62
<211> 269

410-1PCTST25.txt

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62

```

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg Lys Asn Asp Asp
1      5      10      15
Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe
20      25      30
Phe His Gln Val Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln
35      40      45
Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile Leu Ser Ala Pro
50      55      60
Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu
65      70      75      80
Ile Lys Lys Thr Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu
85      90      95
Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Asp Leu
100     105     110
Arg Ile Arg Arg Thr Gln His Ser Val Leu Ser Arg Lys Phe Val Glu
115     120     125
Ala Met Ala Glu Tyr Asn Glu Ala Gln Thr Leu Phe Arg Glu Arg Ser
130     135     140
Lys Gly Arg Ile Gln Arg Gln Leu Glu Ile Thr Gly Arg Thr Thr Thr
145     150     155     160
Asp Asp Glu Leu Glu Glu Met Leu Glu Ser Gly Lys Pro Ser Ile Phe
165     170     175
Thr Ser Asp Ile Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Arg Gln Ala Leu Asn
180     185     190
Glu Ile Glu Ser Arg His Lys Asp Ile Met Lys Leu Glu Thr Ser Ile
195     200     205
Arg Glu Leu His Glu Met Phe Met Asp Met Ala Met Phe Val Glu Thr
210     215     220
Gln Gly Glu Met Ile Asn Asn Ile Glu Arg Asn Val Met Asn Ala Thr
225     230     235     240
Asp Tyr Val Glu His Ala Lys Glu Glu Thr Lys Lys Ala Ile Lys Tyr
245     250     255

```

410-1PCTST25.txt

Gln Ser Lys Ala Arg Arg Val Ser Leu Ala Ser Lys Asn
 260 265

<210> 63
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63

Gln Met Ala Ala Leu Ala Pro Leu Pro Pro Leu Pro Ala Gln Phe Lys
 1 5 10 15

Ser Ile Gln His His Leu Arg Thr Ala Gln Glu His Asp Lys Arg Asp
 20 25 30

Pro Val Val Ala Tyr Tyr Cys Arg Leu Tyr Ala Met Gln Thr Gly Met
 35 40 45

Lys Ile Asp Ser Lys Thr Pro Glu Cys Arg Lys Phe Leu Ser Lys Leu
 50 55 60

Met Asp Gln Leu Glu Ala Leu Lys Lys Gln Leu Gly Asp Asn Glu Ala
 65 70 75 80

Ile Thr Gln Glu Ile Val Gly Cys Ala Leu Glu Asn Tyr Ala Leu Lys
 85 90 95

Met Phe Leu Tyr Ala Asp Asn Glu Asp Arg Ala Gly Arg Phe His Lys
 100 105 110

Asn Met Ile Lys Ser Phe Tyr Thr Ala Ser Leu Leu Ile Asp Val Ile
 115 120 125

Thr Val Phe Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asn Val Lys His Arg Lys Tyr
 130 135 140

Ala Arg Trp Lys Ala Thr Tyr Ile His Asn Cys Leu Lys Glu Trp Gly
 145 150 155 160

Asp Ser Ser Ser Arg Pro Cys Trp Glu Leu Lys Lys Ile Met Ile Leu
 165 170 175

Lys Lys Met Lys Met Leu Glu Gln Pro Leu Cys Pro Leu Ser Gln Leu
 180 185 190

Ser His His His Leu Gln Leu Met Thr Gln Gln His Ala Ile Arg Gln
 195 200 205

Leu Tyr Trp Asn Thr Asp Ser Ser Gly Cys Thr Arg Ser Ser
 210 215 220

410-1PCTST25.txt

<210> 64
 <211> 1527
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 64
 atggaacgaa ggcgtttgtg gggttccatt cagagccgat acatcagcat gagtgtgtgg 60
 acaagcccac ggagacttgt ggagctggca gggcagagcc tgctgaagga tgaggccctg 120
 gccattgccg ccctggagtt gctgcccagg gagctcttcc cgccactctt catggcagcc 180
 tttgacggga gacacagcca gaccctgaag gcaatggtgc aggcctggcc cttcacctgc 240
 ctccctcttg gagtgctgat gaagggacaa catcttcacc tggagacctt caaagctgtg 300
 cttgatggac ttgatgtgct ctttgcccag gaggttcgcc ccaggagggtg gaaacttcaa 360
 gtgctggatt tacggaagaa ctctcatcag gacttctgga ctgtatggtc tggaaacagg 420
 gccagtctgt actcatttcc agagccagaa gcagctcagc ccatgacaaa gaagcgaaaa 480
 gtagatgggt tgagcacaga ggcagagcag cccttcattc cagtagaggt gctcgtagac 540
 ctgttcctca aggaagggtgc ctgtgatgaa ttgttctcct acctcattga gaaagtgaag 600
 cgaaagaaaa atgtactacg cctgtgctgt aagaagctga agatttttgc aatgcccatg 660
 caggatatca agatgatcct gaaaatggtg cagctggact ctattgaaga tttggaagtg 720
 acttgtacct ggaagctacc caccttggcg aaattttctc cttacctggg ccagatgatt 780
 aatctgcgta gactcctcct ctcccacatc catgcatctt cctacatttc cccggagaag 840
 gaagagcagt atatcgcca gttcacctct cagttcctca gtctgcagtg cctgcaggct 900
 ctctatgtgg actctttatt tttccttaga ggccgcctgg atcagttgct caggcacgtg 960
 atgaaccctt tggaaaccct ctcaataact aactgccggc tttcggaagg ggatgtgatg 1020
 catctgtccc agagtcccag cgtcagtcag ctaagtgtcc tgagtctaag tggggtcattg 1080
 ctgaccgatg taagtcccga gcccctccaa gctctgctgg agagagcctc tgccaccctc 1140
 caggacctgg tctttgatga gtgtgggatc acggatgata agctccttgc cctcctgcct 1200
 tccctgagcc actgctcca gcttacaacc ttaagcttct acggaattc catctccata 1260
 tctgccttgc agagtctcct gcagcacctc atcgggctga gcaatctgac ccacgtgctg 1320
 tatcctgtcc ccctggagag ttatgaggac atccatggta ccctccacct ggagaggctt 1380
 gcctatctgc atgccaggct cagggagttg ctgtgtgagt tggggcggcc cagcatggtc 1440
 tggcttagtg ccaaccctg tctcactgt ggggacagaa ctttctatga cccggagccc 1500
 atcctgtgcc cctgtttcat gcctaac 1527

<210> 65
 <211> 1296
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 atgggctccg acgtgcggga cctgaacgcg ctgctgcccg ccgtcccctc cctgggtggc 60

410-1PCTST25.txt

```

ggcggcggct gtgccctgcc tgtgagcggc gcggcgcagt gggcgccggt gctggacttt 120
gcgcccccg gcgcttcggc ttacgggtcg ttgggcggcc ccgcgccgcc accgggtccg 180
ccgccacccc cgccgccgcc gcctcactcc ttcacaaac aggagccgag ctggggcggc 240
gcggagccgc acgaggagca gtgcctgagc gccttcactg tccacttttc cggccagttc 300
actggcacag ccggagcctg tcgctacggg cccttcgggtc ctctccgcc cagccaggcg 360
tcatccggcc aggccaggat gtttcctaac gcgccctacc tgcccagctg cctcgagagc 420
cagcccgcta ttcgcaatca gggttacagc acggtcacct tcgacgggac gccagctac 480
ggtcacacgc cctcgacca tgcggcgagc ttccccaacc actcattcaa gcatgaggat 540
cccatgggcc agcagggtc gctgggtgag cagcagtact cggtgccgcc cccgggtctat 600
ggctgccaca cccccaccga cagctgcacc ggcagccagg ctttgctgct gaggacgcc 660
tacagcagtg acaatttata ccaaatgaca tcccagcttg aatgcatgac ctggaatcag 720
atgaacttag gagccacctt aaagggccac agcacagggt acgagagcga taaccacaca 780
acgcccattc tctgcggagc ccaatacaga atacacacgc acggtgtctt cagaggcatt 840
caggatgtgc gacgtgtgcc tggagtagcc ccgactcttg tacggtcggc atctgagacc 900
agtgagaaac gcccttcat gtgtgcttac ccaggctgca ataagagata ttttaagctg 960
tcccacttac agatgcacag caggaagcac actggtgaga aaccatacca gtgtgacttc 1020
aaggactgtg aacgaaggtt ttctcgttca gaccagctca aaagacacca aaggagacat 1080
acaggtgtga aaccattcca gtgtaaaact tgtcagcgaa agttctcccg gtccgaccac 1140
ctgaagaccc acaccaggac tcatacaggt aaaacaagtg aaaagccctt cagctgtcgg 1200
tggccaagtt gtcagaaaaa gtttgcccgg tcagatgaat tagtccgcca tcacaacatg 1260
catcagagaa acatgaccaa actccagctg gcgctt 1296

```

```

<210> 66
<211> 1179
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 66
atggaggagc cgagtcaga tcctagcgtc gagccccctc tgagtcagga aacattttca 60
gacctatgga aactacttcc tgaaaacaac gttctgtccc cttgcccgtc ccaagcaatg 120
gatgatttga tgctgtcccc ggacgatatt gaacaatggt tcaactgaaga ccaggtcca 180
gatgaagctc ccagaatgcc agaggctgct cccgcgctgg cccctgcacc agcagctcct 240
acaccggcgg cccctgcacc agccccctcc tggcccctgt catcttctgt cccttcccag 300
aaaacctacc agggcagcta cggtttccgt ctgggcttct tgcattctgg gacagccaag 360
tctgtgactt gcacgtactc ccctgccctc aacaagatgt tttgccaaact ggccaagacc 420
tgccctgtgc agctgtgggt tgattccaca cccccgccg gcacccgcgt ccgcgccatg 480
gccatctaca agcagtcaca gcacatgacg gaggttgtga ggcgctgccc ccacatgag 540
cgctgctcag atagcgatgg tctggcccct cctcagcatc ttatccgagt ggaaggaaat 600

```

410-1PCTST25.txt

ttgctgtgtg	agtatttgga	tgacagaaac	acttttcgac	atagtgtggt	ggtgccctat	660
gagccgcctg	aggttggctc	tgactgtacc	accatccact	acaactacat	gtgtaacagt	720
tcctgcatgg	gcggcatgaa	ccggaggccc	atcctcacca	tcatcacact	ggaagactcc	780
agtggtaatc	tactgggacg	gaacagcttt	gaggtgcgtg	tttgtgcctg	tcctgggaga	840
gaccggcgca	cagaggaaga	gaatctccgc	aagaaagggg	agcctcacca	cgagctgccc	900
ccaggagca	ctaagcgagc	actgccaac	aacaccagct	cctctcccca	gccaaagaag	960
aaaccactgg	atggagaata	tttcaccctt	cagatccgtg	ggcgtgagcg	cttcgagatg	1020
ttccgagagc	tgaatgaggc	cttggaactc	aaggatgccc	aggctgggaa	ggagccaggg	1080
gggagcaggg	ctcactccag	ccacctgaag	tccaaaaagg	gtcagtctac	ctcccgccat	1140
aaaaaactca	tgttcaagac	agaagggcct	gactcagac			1179

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/62 C07K14/705 C07K14/47 A61K38/17 A61K31/7088

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NGUYEN P ET AL: "Antigen-specific targeting of CD8+ T cells with receptor-modified T lymphocytes." GENE THERAPY, vol. 10, no. 7, April 2003 (2003-04), pages 594-604, XP002314391 ISSN: 0969-7128 the whole document</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 January 2005

Date of mailing of the international search report

14/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schneider, P

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARQUES ERNESTO T A JR ET AL: "HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 39, 26 September 2003 (2003-09-26), pages 37926-37936, XP002314392 ISSN: 0021-9258 the whole document	
A	WETTSTEIN D A ET AL: "EXPRESSION OF A CLASS II MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX MHC HETERODIMER IN A LIPID-LINKED FORM WITH ENHANCED PEPTIDE-SOLUBLE MHC COMPLEX FORMATION AT LOW PH" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 174, no. 1, 1991, pages 219-228, XP002314393 ISSN: 0022-1007 cited in the application the whole document	
A	WO 02/080851 A (AUGUST THOMAS; MARQUES ERNESTO JR; UNIV JOHNS HOPKINS) 17 October 2002 (2002-10-17) the whole document	
A	US 2002/151707 A1 (DESHPANDE SHRINKANT ET AL) 17 October 2002 (2002-10-17) the whole document	
P,A	MARGALIT A ET AL: "Chimeric beta2 microglobulin/CD3zeta polypeptides expressed in T cells convert MHC class I peptide ligands into T cell activation receptors: A potential tool for specific targeting of pathogenic CD8+ T cells" INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 15, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 1379-1387, XP009039662 ISSN: 0953-8178 the whole document	
P,A	WO 2004/015395 A (NAT JEWISH MEDICAL AND RES CT) 19 February 2004 (2004-02-19) the whole document	

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/011512

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02080851	A	17-10-2002	CA 2446462 A1	17-10-2002
			EP 1385538 A2	04-02-2004
			WO 02080851 A2	17-10-2002
US 2002151707	A1	17-10-2002	AU 6331696 A	30-12-1996
			CA 2224205 A1	19-12-1996
			EP 0833930 A2	08-04-1998
			JP 11507238 T	29-06-1999
			WO 9640944 A2	19-12-1996
			US 6060309 A	09-05-2000
WO 2004015395	A	19-02-2004	WO 2004015395 A2	19-02-2004
			US 2004110253 A1	10-06-2004

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/62 C07K14/705 C07K14/47 A61K38/17 A61K31/7088

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>NGUYEN P ET AL: "Antigen-specific targeting of CD8+ T cells with receptor-modified T lymphocytes." GENE THERAPY, Bd. 10, Nr. 7, April 2003 (2003-04), Seiten 594-604, XP002314391 ISSN: 0969-7128 das ganze Dokument</p> <p>-----</p> <p>-/--</p>	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Januar 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14/02/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schneider, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MARQUES ERNESTO T A JR ET AL: "HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 278, Nr. 39, 26. September 2003 (2003-09-26), Seiten 37926-37936, XP002314392 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument	
A	WETTSTEIN D A ET AL: "EXPRESSION OF A CLASS II MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX MHC HETERODIMER IN A LIPID-LINKED FORM WITH ENHANCED PEPTIDE-SOLUBLE MHC COMPLEX FORMATION AT LOW PH" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, Bd. 174, Nr. 1, 1991, Seiten 219-228, XP002314393 ISSN: 0022-1007 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	
A	WO 02/080851 A (AUGUST THOMAS; MARQUES ERNESTO JR; UNIV JOHNS HOPKINS) 17. Oktober 2002 (2002-10-17) das ganze Dokument	
A	US 2002/151707 A1 (DESHPANDE SHRINKANT ET AL) 17. Oktober 2002 (2002-10-17) das ganze Dokument	
P,A	MARGALIT A ET AL: "Chimeric beta2 microglobulin/CD3zeta polypeptides expressed in T cells convert MHC class I peptide ligands into T cell activation receptors: A potential tool for specific targeting of pathogenic CD8+ T cells" INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, Bd. 15, Nr. 11, November 2003 (2003-11), Seiten 1379-1387, XP009039662 ISSN: 0953-8178 das ganze Dokument	
P,A	WO 2004/015395 A (NAT JEWISH MEDICAL AND RES CT) 19. Februar 2004 (2004-02-19) das ganze Dokument	

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 02080851	A	17-10-2002	CA	2446462 A1	17-10-2002
			EP	1385538 A2	04-02-2004
			WO	02080851 A2	17-10-2002
<hr/>					
US 2002151707	A1	17-10-2002	AU	6331696 A	30-12-1996
			CA	2224205 A1	19-12-1996
			EP	0833930 A2	08-04-1998
			JP	11507238 T	29-06-1999
			WO	9640944 A2	19-12-1996
			US	6060309 A	09-05-2000
<hr/>					
WO 2004015395	A	19-02-2004	WO	2004015395 A2	19-02-2004
			US	2004110253 A1	10-06-2004
<hr/>					